



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN**

**LA MASA MADRE EN PANIFICACIÓN: MICROBIOLOGÍA, PROCESO Y  
CALIDAD.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

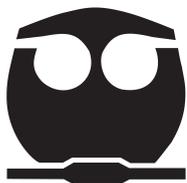
**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ANA KAREN PÉREZ VALDEZ**

**CDMX**

**AÑO 2022**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: VELÁZQUEZ MADRAZO OLGA DEL CARMEN

**VOCAL:** Profesor: DIAZ RUIZ GLORIA

**SECRETARIO:** Profesor: CONCA TORRES ARMANDO

**1er. SUPLENTE:** Profesor: RUIZ TERÁN FRANCISCO

**2° SUPLENTE:** Profesor: DIAZ GUTIERREZ KARLA MERCEDES

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DIAZ RUIZ GLORIA**

**SUSTENTANTE (S):**

**PÉREZ VALDEZ ANA KAREN**

# Agradecimientos

# Dedicatorias

# Índice de contenido

<b>Introducción</b> .....	<b>9</b>
<b>Marco teórico</b> .....	<b>10</b>
<b>Metodología</b> .....	<b>11</b>
<b>Capítulo 1. Historia de la panificación, métodos de elaboración de pan. Ingredientes y su función</b> .....	<b>13</b>
1.1. Historia de la panificación .....	13
1.2. Métodos de elaboración del pan .....	15
1.2.1. Sistemas de elaboración .....	15
1.2.2. Procesos de elaboración .....	16
1.2.2.1. Pesaje y medición .....	17
1.2.2.2. Amasado .....	17
1.2.2.3. División y pesado .....	17
1.2.2.4. Heñido o boleado .....	17
1.2.2.5. Reposo .....	17
1.2.2.6. Formado .....	18
1.2.2.7. Fermentación .....	18
1.2.2.8. Corte .....	19
1.2.2.9. Cocción .....	19
1.2.3. Tendencias actuales en procesos de elaboración .....	21
1.2.3.1. Fermentación controlada .....	21
1.2.3.2. Congelación de las masas .....	21
1.2.3.3. Pan precocido congelado .....	21
1.3. Ingredientes y su función .....	22
1.3.1. Harina .....	23
1.3.2. Agua .....	24
1.3.3. Sal .....	25
1.3.4. Levadura .....	25
1.3.4.1. Tipos de levadura utilizados en panificación .....	25

1.3.5. Otros componentes del pan .....	26
<b>Capítulo 2. Panificación con masa madre. Generalidades .....</b>	<b>29</b>
2.1. Generalidades .....	29
2.1.1. Definición .....	29
2.1.2. Preparación .....	30
2.2. Panificación con masa madre .....	30
2.2.1. Influencia de la masa madre sobre las características de la masa panaria .....	32
2.2.1.1. Características reológicas .....	32
2.2.1.2. Características fermentativas .....	32
2.3. Propiedades de la masa madre .....	32
2.3.1. Rendimiento de la masa .....	33
2.3.2. Temperatura .....	33
2.3.3. Cultivos iniciadores .....	33
2.3.4. Acidez y pH titulables .....	34
2.3.5. Sustrato .....	34
<b>Capítulo 3. Tipos de masa madre y productos .....</b>	<b>36</b>
3.1. Tipos de masa madre .....	36
3.1.1. Masa madre Tipo I .....	36
3.1.2. Masa madre Tipo II .....	36
3.1.3. Masa madre Tipo III .....	36
3.2. Productos elaborados a partir de masa madre .....	38
3.2.1. Productos horneados de masa madre salada .....	38
3.2.1.1. Pan de San Francisco .....	39
3.2.2. Productos horneados de masa madre dulce .....	41
3.2.2.1. Panettone .....	41
3.2.3. Galletas de masa madre .....	42
3.2.4. Otro productos .....	44
3.2.4.1. Producción de pan de centeno .....	44
3.2.4.2. Shalgam .....	45
3.2.4.3. Boza .....	45

<b>Capítulo 4. Microbiota y metabolitos de la masa madre. Métodos para su estudio .....</b>	<b>47</b>
4.1. <i>Lactobacillus</i> .....	47
4.2. <i>Pediococcus</i> .....	48
4.3. <i>Leuconostoc</i> .....	49
4.4. <i>Weissella</i> .....	49
4.5. Levaduras .....	50
4.6. Vías metabólicas de BAL .....	50
4.7. Metabolismo de carbohidratos en LAB .....	53
4.8. Metabolismo de compuestos nitrogenados en LAB .....	54
4.9. Producción de EPS .....	57
4.10. Metabolitos volátiles en la masa madre .....	59
4.11 Métodos de identificación de bacterias ácido lácticas (BAL) .....	61
4.11.1 Métodos tradicionales .....	61
4.11.1.1. Estudios microscópicos .....	61
4.11.1.2. Estudios macroscópicos .....	62
4.11.2. Identificación bioquímica .....	65
4.11.2.1 Pruebas primarias .....	66
4.11.2.1.1 Prueba de catalasa.....	66
4.11.2.1.2 Prueba de oxidasa. ....	66
4.11.2.1.3 Prueba de oxidación-fermentación (O/F) .....	66
4.11.2.2. Pruebas secundarias .....	67
4.11.2.2.1. Fermentación de carbohidratos .....	67
4.11.2.2.2. Métodos rápidos comerciales para la identificación de bacterias .....	68
4.11.2.2.3. API 50 CHL .....	68
4.11.3. Métodos moleculares .....	69
4.11.3.1 Dependientes del cultivo .....	70
4.11.3.1.1 Porcentaje G-C .....	70
4.11.3.1.2 Electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE) .....	70
4.11.3.1.3. Amplificación de ADN polimórfico al azar (RAPD) .....	71

4.11.3.1.4. Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA) .....	71
4.11.3.1.5. Amplificación de fragmentos largos polimórficos (AFLP) .....	71
4.11.3.1.6. Identificación de bacterias por secuenciación del gen ribosomal 16S .....	71
4.11.3.2 Independientes del cultivo .....	73
4.11.3.2.1. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) .....	73
4.11.4. Métodos nuevos .....	73
4.11.4.1 Secuenciación de Genomas Completos .....	73
4.11.4.2 Ciencias Ómicas .....	74
4.12 Métodos de identificación de metabolitos volátiles .....	75
4.12.1 Determinación de carbohidratos, ácidos orgánicos y alcoholes .....	75
4.12.1.1 Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC) .....	76
4.13 Métodos de identificación de exopolisacáridos .....	76
4.13.1 Filtración por membrana .....	77
4.13.2 Cromatografía de permeación en gel (GPC) .....	78
4.13.3 Cromatografía Hidrodinámica (HDC) .....	78
4.13.4 Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) .....	78
4.13.5 Espectroscopía de RMN de alta resolución .....	79
4.14 Aplicaciones beneficiosas de la tecnología de masa madre .....	79
4.14.1 Fibra dietética (DF) en masa madre .....	79
4.14.2 EPS de <i>Lactobacilli</i> .....	82
4.14.3 Desarrollo de sabor .....	83
4.14.4 Influencia de la masa madre en la digestibilidad del almidón .....	84

**Capítulo 5. Vida de anaquel e inocuidad de los productos elaborados con masa madre.....86**

5.1. Duración .....	86
5.2. Actividad antibacteriana y anti-moho .....	86

5.2.1 Actividad antibacterial .....	87
5.2.2. Actividad anti-moho .....	88
5.3. Tendencias del uso de la masa madre.....	88
<b>Conclusiones.....</b>	<b>91</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>93</b>

### **Lista de Figuras**

Figura 1. Pan encontrado en Pompeya bajo las cenizas del volcán del monte Vesubio .....	14
Figura 2. Los egipcios y el pan .....	14
Figura 3. La esponja es un sistema de elaboración que se caracteriza por ser muy húmedo y pegajoso .....	16
Figura 4. Diagrama de flujo del proceso de elaboración del pan .....	20
Figura 5. Diagramas de flujo comparativos de las tendencias actuales en planificación que conllevan aplicación de frío industrial .....	22
Figura 6. Factores que rigen la calidad de la panificación y las propiedades reológicas de la masa de trigo .....	24
Figura 7 . Breve esquema de producción de pan de masa madre .....	31
Figura 8. Esquema de los procesos de producción de masa madre .....	37
Figura 9. Pan de Altamura .....	38
Figura 10. Pan de Montecalvo .....	39
Figura 11. Proceso de producción del pan francés San Francisco .....	40
Figura 12. Pan de masa madre de San Francisco .....	40
Figura 13. Panettone .....	41
Figura 14. Diagrama de elaboración de Panettone .....	42
Figura 15. Galleta Cracker Fermentada .....	43
Figura 16. Diagrama de elaboración de galleta fermentada .....	44
Figura 17. Rutas metabólicas de carbohidratos en BAL .....	52
Figura 18. Contribución de las bacterias del ácido láctico a la proteólisis en masas madre ...	56
Figura 19. Eventos proteolíticos durante la fermentación de la masa madre: enzimas clave y actividades metabólicas para la proteólisis primaria y secundaria. La representación del	

macropolímero de gluten .....	57
Figura 20. Modelo tridimensional de la “envoltura o cubierta” de una bacteria Gram positiva .....	62
Figura 21. Modelo tridimensional de la cubierta o envoltura celular de la bacteria Gram negativa .....	62
Figura 22. <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393. Agar MRS .....	63
Figura 23. Representación de las pruebas de oxidación-fermentación .....	67
Figura 24. Tira API® 50 – CHL utilizado para la identificación de lactobacilos, galería conformada por 50 microtubos .....	69
Figura 25. Proceso de secuenciación del genoma completo (WGS) .....	74
Figura 26. Principales ventajas de las ciencias ómicas en el estudio de los alimentos fermentados .....	75
Figura 27. Esquema de un HPLC .....	76
Figura 28. Unidades poliméricas de $\beta$ -(1-4)-D-glucopiranosil $\beta$ -(1-3)-D-glucopiranosil ...	81

### Lista de tablas

Tabla 1. Otros ingredientes del pan y su función .....	27
Tabla 2. Ejemplos de aditivos permitidos en la elaboración de productos de panificación ...	27
Tabla 3. Especies de <i>Lactobacillus</i> generalmente asociadas con la fermentación de la masa madre o que se encuentran en la masa madre fermentada .....	48
Tabla 4. Principales grupos de proteasas de los granos de trigo en reposo y germinados .....	54
Tabla 5. Compuestos volátiles identificados en masas madre de trigo imitadas e inoculadas .....	60
Tabla 6. Investigaciones y patentes más recientes relacionadas a la masa madre .....	89

# Introducción

**Planteamiento del problema:** Dado que el pan es uno de los productos más consumidos a nivel mundial y que a través del tiempo se ha elaborado mediante diversas tecnologías obteniendo variadas características de alto impacto en el consumidor, este proyecto busca estudiar a profundidad la importancia del uso de la masa madre en la elaboración de productos de panificación y de este modo entender los atributos que aporta a estos alimentos, mejorando así la calidad de los mismos.

**Hipótesis del trabajo:** Si se realiza una investigación de carácter documental con relación a la masa madre, orientándose en su proceso, microbiota y características, se logrará entender el efecto que esta tiene sobre los atributos de calidad y sensoriales en los productos de panificación elaborados a partir de ella.

**El objetivo general** de esta investigación es describir a la masa madre, así como detallar sus características y los aportes de mayor relevancia de su uso en la elaboración de productos de panificación, analizando la información disponible a través de la búsqueda en bases de datos de la Biblioteca Digital UNAM.

Para los **objetivos específicos**, se pretende:

- Detallar los procesos de elaboración y tipos de masa madre.
- Explicar los atributos de calidad y el impacto en la vida de anaquel e inocuidad de los productos obtenidos a partir del uso de la masa madre, realizando una amplia investigación sobre sus características.
- Describir la microbiota de la masa madre, así como los metabolitos producidos durante su fermentación, haciendo uso de la plataforma BIDI UNAM, para recabar la información pertinente.
- Identificar las tendencias más actuales respecto al uso de masas madre.

**La justificación** de la siguiente investigación consiste en mostrar que la masa madre es una favorable fuente de metabolitos como el ácido láctico, ácido acético, entre otros, los cuales son producidos durante su fermentación y que son de gran relevancia para la elaboración de

productos de panificación, dado que contribuyen en los atributos sensoriales, de calidad y de vida de anaquel del producto final. Por lo tanto, este trabajo pretende reunir la información suficiente que sustente los beneficios del uso de masa madre.

## **Marco Teórico**

En la era actual, los consumidores desean tener una amplia gama de alimentos que sean nutritivos y sabrosos y que tengan una vida útil prolongada sin conservadores añadidos. La masa madre es una importante fermentación moderna de harinas de cereales y agua, basada en un proceso espontáneo anterior. Hoy en día esta tecnología se utiliza ampliamente en la fabricación de una variedad de productos como panes, pasteles y galletas saladas, y su aplicación sigue aumentando, mientras se aplica a una gran variedad de harinas de cereales en todo el mundo. La masa madre de trigo se utiliza en más del 30% de los productos de panadería italianos, incluidos más de 200 tipos diferentes de panes de masa madre. (Corsetti y Settanni, 2007)

La masa madre se caracteriza por un ecosistema microbiano complejo, representado principalmente por bacterias ácido lácticas (BAL) que, junto con las levaduras, juegan un papel clave en la fermentación de la masa de pan.

Los factores que afectan la calidad de la masa madre son el rendimiento de la masa, la temperatura, el tipo de cultivo iniciador, la acidez del medio y el sustrato. Estas masas se clasifican en 3 tipos (tipos I, II y III); el más utilizado para la producción comercial es el Tipo III.

La fermentación de la masa madre tiene una serie de efectos beneficiosos que incluyen una vida útil prolongada al inhibir las bacterias de descomposición y el crecimiento de moho, una ganancia de volumen acelerada, un envejecimiento tardío y buen valor nutricional, además de que mejora las características sensoriales como el volumen de la hogaza, la uniformidad del horneado, el color, el aroma, el sabor y la textura de los panes.

Esta investigación se centra en el papel del grupo más importante de bacterias fermentadoras de la masa madre, especies que pertenecen al género *Lactobacillus*, que son los principales responsables del desarrollo del sabor, la mejora de la calidad nutricional y la estabilidad frente a los refrescos consecutivos de masa madre. Los lactobacilos también establecen algunas asociaciones microbianas duraderas. Además, se presenta una descripción general de las herramientas para monitorear las especies predominantes (Corsetti y Settanni, 2007; Katina et al., 2006, Rupesh y Shraddha, 2011).

## Metodología

El siguiente trabajo de investigación es únicamente de índole documental, dado que éste se desarrolló y complementó a partir de estudios ya realizados ante la temática de la masa madre, así como su uso en productos de panificación. El plan de acción que se siguió en la presente investigación se inició con el planteamiento del problema, que para este caso consistió en estudiar a profundidad las características de la masa madre, su uso en la elaboración de productos de panificación y sus aportes más importantes al producto final.

El capítulo 1, consistió en la búsqueda de información para desarrollar en contexto la historia de la panificación, así como los métodos de elaboración del pan, los ingredientes y su respectiva función. Los capítulos 2, 3 y 4, comprenden la información respectiva a la masa madre, en términos de sus generalidades y panificación, tipos y procesos, así como microbiota, metabolitos y métodos para su estudio. El capítulo 5 contiene información sobre la vida de anaquel e inocuidad de los productos elaborados con masa madre y la búsqueda de patentes que permitan visualizar las tendencias más actuales.

De manera general, la metodología empleada en la siguiente investigación, fue realizada a través de la búsqueda y recopilación de información en la base de datos de la Biblioteca Digital UNAM, en donde se utilizaron:

- Libros electrónicos del sistema bibliotecario (SIBIUNAM)
- Tesis digitales de TESIUNAM
- Las Bases de datos Elsevier y Scopus

- Revistas digitales de SERIUNAM

Posteriormente a tener recabada la información necesaria, se realizó un análisis de la misma y se identificaron las tendencias dentro de esta temática a través de la elaboración de una tabla, sintetizando los nuevos estudios respectivos a la masa madre y sus aplicaciones. Finalmente, se elaborará una conclusión que permita responder a la hipótesis y los respectivos objetivos planteados en la investigación.

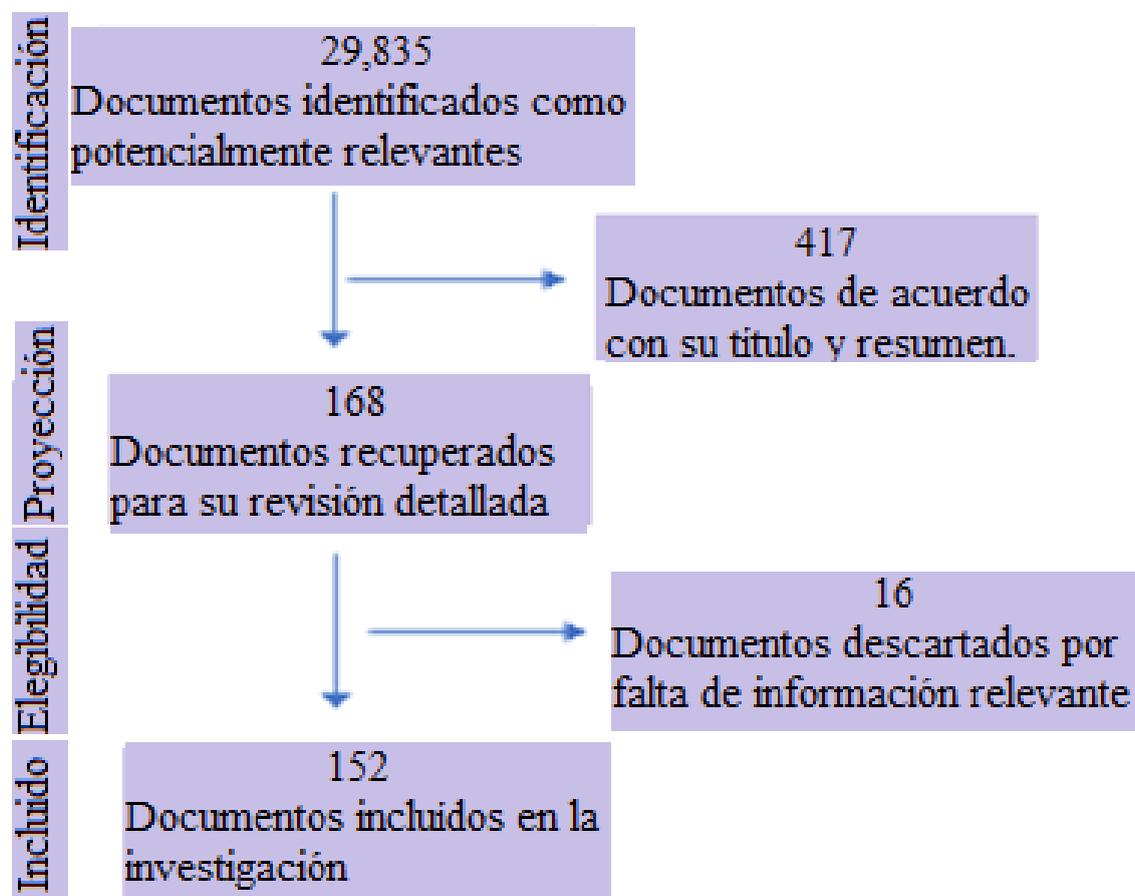


Diagrama de flujo de los estudios incluidos en la investigación.

# Capítulo 1

## Historia de la panificación, métodos de elaboración de pan. Ingredientes y su función.

Los cereales han jugado un papel muy importante en la historia de la civilización, y son la base de la nutrición en gran parte del mundo. Es por ello que han sido objeto de numerosas investigaciones y publicaciones. Sin embargo, pese a la gran producción de cereales en Latinoamérica, la literatura específica sobre su cultivo, procesamiento y productos derivados, en dicho continente, es escasa.

El trigo ha constituido desde el principio de los tiempos la base de la alimentación de la sociedad occidental. El pan se consume en gran cantidad en el mundo en diferentes tipos y formas según los hábitos culturales, en los países donde el consumo de pan está muy extendido, los productos obtenidos del trigo proveen aproximadamente una quinta parte del total de calorías de la dieta.

Los productos de panificación y sus técnicas de producción difieren ampliamente en todo el mundo; el objetivo de la panificación es convertir las harinas de cereales en alimentos atractivos, apetitosos y digeribles. En los procesos de panificación el ingrediente principal es la harina, el producto final depende en buena medida de su calidad y adecuación al proceso, así como del producto a elaborar. Actualmente en muchos países el consumidor exige no sólo pan de calidad, sino variedad de productos (Edel y Rosell, 2007; Rupesh y Shraddha, 2011).

### **1.1 Historia de la panificación.**

Los preparados derivados de grano cocido se han utilizado como alimento desde la prehistoria. La fabricación de pan es probablemente una de las tecnologías más antiguas conocidas por la humanidad, mismo que constituye la base de la alimentación desde hace

7000 u 8000 años. Al principio era una pasta plana, no fermentada, elaborada con una masa de granos machacados burdamente y cocida, muy probablemente sobre piedras planas calientes. Se han desenterrado fragmentos (Figura 1) de pan sin levadura en las ruinas de los poblados situados junto a los lagos suizos, que constituyen las comunidades civilizadas más antiguas de Europa (Mesas y Alegre, 2002: Arroyabe y Esguerra, 2006).



Figura 1. Pan encontrado en Pompeya bajo las cenizas del volcán del monte Vesubio (Curiosfera, 2021).

Parece que fue en Egipto donde apareció el primer pan fermentado y se cree que descubrieron la fermentación de forma accidental cuando se observó que la masa elaborada el día anterior producía burbujas de aire y aumentaba su volumen, y que, añadida a la masa de harina nueva, daba un pan más ligero y de mejor gusto. Existen bajorrelieves egipcios (3000 años a. de C.) (figura 2) sobre la fabricación de pan y cerveza, que sugieren que fue en la civilización egipcia donde se utilizaron por primera vez los métodos bioquímicos de elaboración de estos alimentos fermentados (Mesas y Alegre, 2002: Arroyabe y Esguerra, 2006).

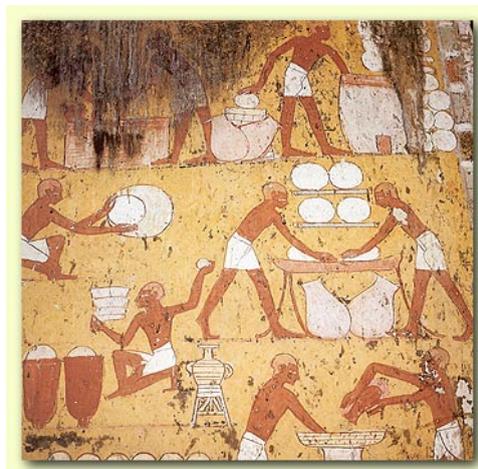


Figura 2. Los egipcios y el pan (Curiosfera, 2021).

Los galos, después de Plinio, utilizaron la espuma de la cerveza para elaborar pan. Esta técnica fue olvidada y redescubierta en el siglo XVII convirtiéndose en práctica habitual en Europa hasta 1800. En el siglo XIX las levaduras de las cervecerías fueron reemplazadas por las procedentes de las destilerías de alcohol de cereales. A finales del siglo XIX, a raíz de los trabajos de Pasteur, se desarrolló una industria específica para la producción de levaduras que culminó en 1920 con un moderno método de producción de levaduras de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*), inventado por el danés Soren Sak y denominado «Método Zero» ya que evita la producción de etanol (Mesas y Alegre, 2002: Arroyabe y Esguerra, 2006).

El tipo de pan consumido tenía implicaciones sociales: el pan blanco era privilegio de los ricos y el negro estaba reservado para los pobres. Se elaboraba a mano en el propio hogar o en el pequeño horno local hasta finales del siglo XIX, cuando el trabajo manual fue reemplazado por máquinas. Durante los siglos XIX y XX los oficios familiares dan paso a la construcción de fábricas que incrementaron la capacidad de producción de alimentos básicos, entre ellos el pan y los productos de panadería. Hay panificadoras actuales que utilizan amasadoras, cintas transportadoras, hornos automáticos y máquinas para enfriar, cortar y envolver el pan (Mesas y Alegre, 2002: Arroyabe y Esguerra, 2006).

Actualmente se han presentado dos tendencias hasta cierto punto contrapuestas. Por un lado, los cambios en el estilo de vida y la difusión de los congeladores y de los hornos microondas han conllevado un aumento de la demanda de alimentos (entre ellos el pan) de más cómoda preparación y adecuados para su almacenamiento en congeladores. Por otro lado, existe también una cierta demanda de alimentos lo más parecidos posible al alimento tradicional. Estas dos tendencias han tenido una repercusión importante en la panificación moderna (Mesas y Alegre, 2002: Arroyabe y Esguerra, 2006).

## **1.2 Métodos de elaboración de pan.**

### **1.2.1 Sistemas de elaboración**

Existen tres sistemas generales de elaboración de pan que vienen determinados principalmente por el tipo de levadura utilizado y son los siguientes:

- **Directo:** es el menos frecuente y se caracteriza por utilizar exclusivamente levadura comercial. Requiere un periodo de reposo de la masa de unos 45 minutos antes de la división de la misma. No es útil en procesos mecanizados con división automática volumétrica.
- **Mixto:** es el sistema más frecuente en la elaboración de pan común. Utiliza simultáneamente masa madre (levadura natural) y levadura comercial. Requiere un reposo previo a la división de la masa de sólo 10–20 minutos. Es el más recomendable cuando la división de la masa se hace por medio de una divisora volumétrica.
- **Esponja:** es el sistema universalmente empleado en la elaboración de pan francés y sobre todo en la de pan de molde. Consiste en elaborar una masa líquida (esponja) con el 30 – 40% del total de la harina, la totalidad de la levadura (comercial) y tantos litros de agua como kilos de harina. Se deja reposar unas horas, se incorpora el resto de la harina y del agua y a partir de ahí se procede como en el método directo (figura 3) (Mesas y Alegre, 2002).



Figura 3. La esponja (derecha) es un sistema de elaboración que se caracteriza por ser muy húmedo y pegajoso (Reynhart, 2006).

### **1.2.2 Proceso de elaboración**

Con las particularidades propias de cada sistema de elaboración y de cada tipo de pan, el proceso de elaboración consta de las siguientes etapas:

### **1.2.2.1. Pesaje y medición (Preparación de los ingredientes)**

Se realiza de acuerdo con las cantidades establecidas en la formulación para cada producto, este pesaje se debe realizar lo más preciso posible de lo contrario los productos podrían presentar una amplia variedad de defectos (Mesas y Alegre, 2002).

### **1.2.2.2 Amasado.**

Sus objetivos son lograr la mezcla íntima de los distintos ingredientes y conseguir, por medio del trabajo físico del amasado, las características plásticas de la masa, así como su oxigenación. El amasado se realiza en máquinas denominadas amasadoras, que constan de una artesa móvil donde se colocan los ingredientes y de un elemento amasador cuyo diseño determina en cierto modo los distintos tipos de amasadoras, siendo las de brazos de movimientos variados (sistema Artofex) y las espirales (brazo único en forma de «rabo de cerdo») las más comúnmente utilizadas en la actualidad (Mesas y Alegre, 2002).

### **1.2.2.3. División y pesado.**

Su objetivo es dar a las piezas el peso justo. Si se trata de piezas grandes se suelen pesar a mano. Si se trata de piezas pequeñas se puede utilizar una divisora hidráulica, pesando a mano un fragmento de masa, múltiplo del número de piezas que da la divisora. En las grandes panificadoras donde el rendimiento horario oscila entre las 1000 y 5000 piezas se suele recurrir a las divisoras volumétricas continuas (Mesas y Alegre, 2002).

### **1.2.2.4. Heñido o boleado.**

Consiste en dar forma de bola al fragmento de masa y su objetivo es reconstruir la estructura de la masa tras la división. Puede realizarse a mano, si la baja producción o el tipo de pan así lo aconsejan. O puede realizarse mecánicamente por medio de boleadoras siendo las más frecuentes las formadas por un cono truncado giratorio (Mesas y Alegre, 2002).

### **1.2.2.5. Reposo.**

Su objetivo es dejar descansar la masa para que se recupere de la desgasificación sufrida durante la división y boleado. Esta etapa puede ser llevada a cabo a temperatura ambiente en

el propio obrador o mucho mejor en las denominadas cámaras de bolsas, en las que se controla la temperatura y el tiempo de permanencia en la misma (Mesas y Alegre, 2002).

#### **1.2.2.6. Formado.**

Su objetivo es dar la forma que corresponde a cada tipo de pan. Si la pieza es redonda, el resultado del boleado proporciona ya dicha forma. Si la pieza es grande o tiene un formato especial suele realizarse a mano. Si se trata de barras, que a menudo suponen más del 85% de la producción de una panadería, se realiza por medio de máquinas formadoras de barras en las que dos rodillos que giran en sentido contrario aplastan el fragmento de masa y lo enrollan sobre sí mismo (Mesas y Alegre, 2002).

#### **1.2.2.7. Fermentación.**

Consiste básicamente en una fermentación alcohólica llevada a cabo por levaduras que transforman los azúcares fermentables en etanol,  $CO_2$  y algunos productos secundarios. En el caso de utilizar levadura de masa se producen en menor medida otras fermentaciones llevadas a cabo por bacterias. Los objetivos de la fermentación son la formación de  $CO_2$ , para que al ser retenido por la masa ésta se esponje, y mejorar el sabor del pan como consecuencia de las transformaciones que sufren los componentes de la harina (Mesas y Alegre, 2002).

En un sentido amplio la fermentación se produce durante todo el tiempo que transcurre desde que se han mezclado todos los ingredientes (amasado) hasta que la masa ya dentro del horno alcanza unos 50 °C en su interior. En la práctica se habla de varias fases o etapas:

- La prefermentación correspondiente a la elaboración de la masa madre o de la esponja en los métodos indirectos.
- La fermentación en masa, es el periodo de reposo que se da a la masa desde que finaliza el amasado hasta que la masa se divide en piezas. Es una etapa larga en la panificación francesa y en algunas elaboraciones españolas como la chapata gallega, pero es muy corta o inexistente en las elaboraciones mecanizadas del pan común español.

- La fermentación intermedia, es el periodo de reposo que se da a la masa en las cámaras de bolsas tras el boleado y antes del formado.
- La fermentación final o fermentación en piezas es el periodo de reposo que se da a las piezas individuales desde que se practica el formado hasta que se inicia el horneado del pan. Esta fase suele realizarse en cámaras de fermentación climatizadas a 30 °C y 75% de humedad durante 60 a 90 minutos, aunque los tres parámetros pueden variar según las necesidades del panadero (Mesas y Alegre, 2002).

#### **1.2.2.8. Corte.**

Operación intermedia que se hace después de la fermentación, justo en el momento en que el pan va a ser introducido en el horno. Consiste en practicar pequeñas incisiones en la superficie de las piezas. Su objetivo es permitir el desarrollo del pan durante la cocción (Mesas y Alegre, 2002).

#### **1.2.2.9. Cocción.**

Su objetivo es la transformación de la masa fermentada en pan, lo que conlleva: evaporación de todo el etanol producido en la fermentación, evaporación de parte del agua contenida en el pan, coagulación de las proteínas, gelatinización del almidón y pardeamiento de la corteza. La cocción se realiza en hornos a temperaturas que van desde los 220 a los 260 °C, aunque el interior de la masa nunca llega a rebasar los 100 °C (Mesas y Alegre, 2002).

Los hornos utilizados en panadería pueden ser continuos (hornos de túnel), cuando es posible alimentarlos con una secuencia ilimitada de piezas, o discontinuos cuando una vez cargados con la totalidad de las piezas hay que esperar a que se cuezan para sacarlas e introducir una nueva carga (hornos de solera, hornos de pisos, hornos de carros, etc.) (Mesas y Alegre, 2002).

Tras la cocción y enfriamiento el pan está listo para su consumo, aún así el proceso completo puede que conlleve rebanado y/o empaquetado (Mesas y Alegre, 2002).

La Figura 4 muestra el diagrama de flujo del proceso de elaboración del pan diferenciando entre operaciones activas y fases de reposo e indicando las operaciones opcionales en función de los distintos métodos de elaboración (Mesas y Alegre, 2002).

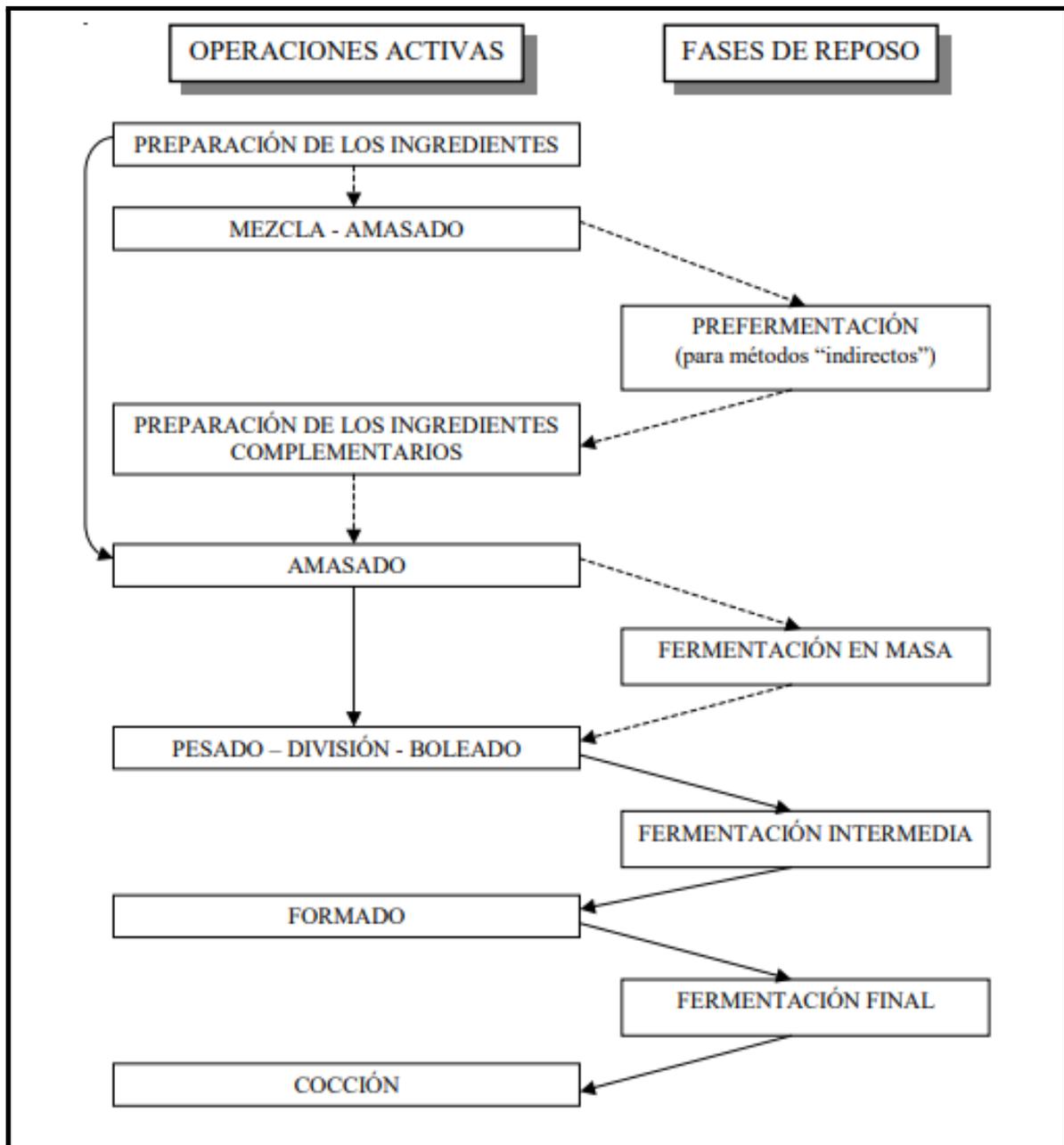


Figura 4. Diagrama de flujo del proceso de elaboración del pan. → Operación fija; - - > Operación opcional (Mesas y Alegre, 2002).

### **1.2.3 Tendencias actuales en procesos de elaboración**

Los cambios de estilo de vida de la sociedad moderna, unidos al exigente deseo del consumidor por disponer de pan reciente de modo constante, han hecho evolucionar la panificación con una serie de tendencias actuales que distan bastante de la forma tradicional de elaborar pan. Estas tendencias son las siguientes:

#### **1.2.3.1. Fermentación controlada.**

Consiste en bloquear por frío la fermentación y reactivarla en el momento deseado. Su principal objetivo es permitir un constante suministro de pan (Mesas y Alegre, 2002).

#### **1.2.3.2. Congelación de las masas.**

Consiste en congelar las masas crudas, ya sea antes o después del formado, con el fin de distanciar los procesos del amasado y la cocción. Con un objetivo similar al anterior, esta técnica permite separar las etapas del proceso en el tiempo y en el espacio ya que es en los puntos de venta, frecuentemente distanciados del punto de elaboración, donde se realiza la descongelación y cocción del pan. Esta técnica permite asimismo a las pequeñas panaderías disponer de una amplia gama de productos de menor venta sin tener que elaborar a diario (Mesas y Alegre, 2002).

#### **1.2.3.3. Pan precocido congelado.**

Consiste en cocer el pan en 2 etapas mediando entre ellas un periodo de congelación más o menos largo, lo que permite disponer de pan caliente de forma constante en terminales de cocción sin necesidad de disponer en ellos de personal altamente calificado como es el caso del empleo de masas congeladas (Mesas y Alegre, 2002).

En la Figura 5 se comparan los diagramas de flujo de las tendencias actuales de panificación que conllevan aplicación de frío. En ella se constata que salvo por el momento de aplicación del frío el proceso es semejante en todos los casos y no muy distinto del proceso tradicional (Mesas y Alegre, 2002).

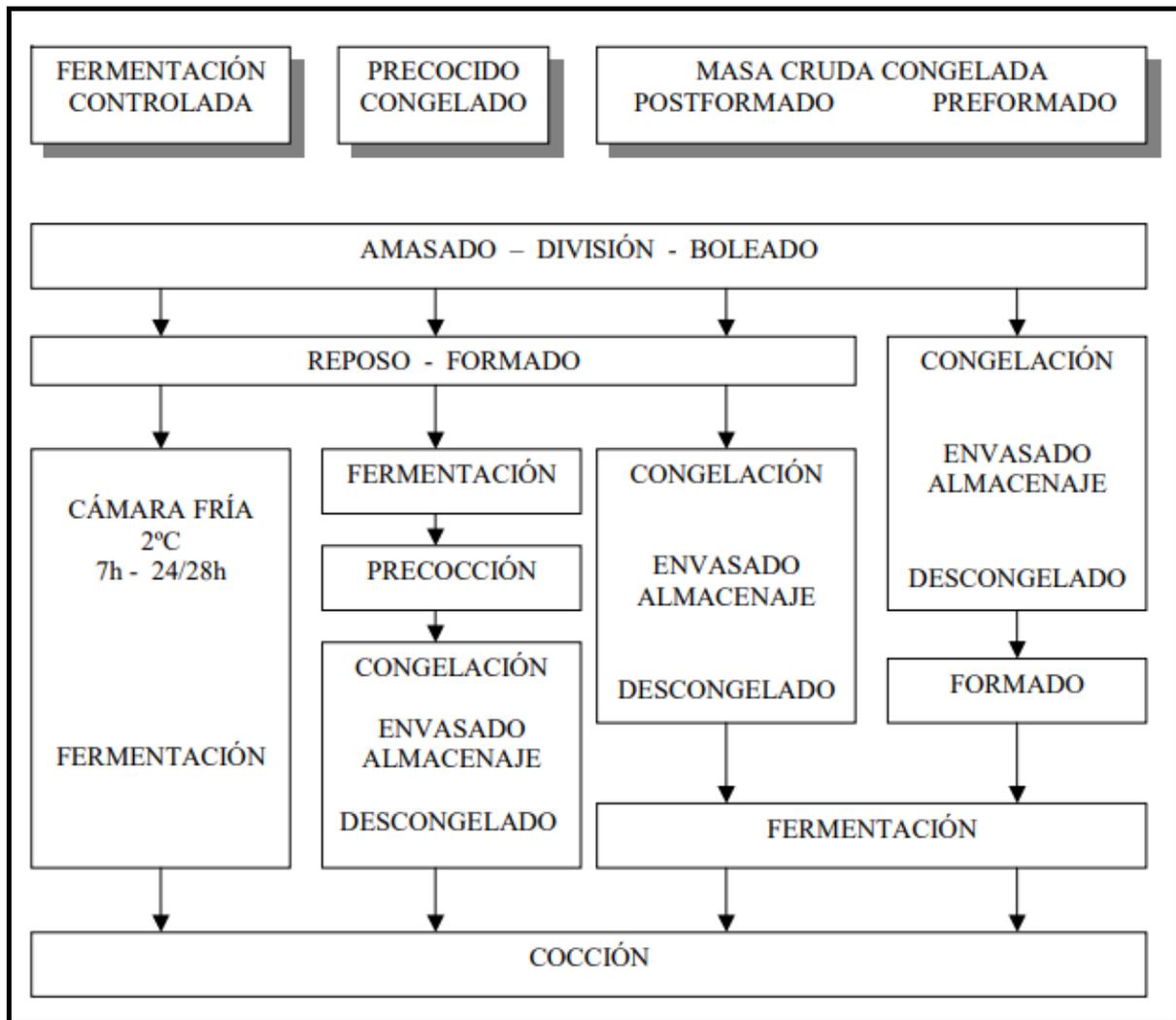


Figura 5. Diagramas de flujo comparativos de las tendencias actuales en planificación que conllevan aplicación de frío industrial (Mesas y Alegre, 2002).

### **1.3 Ingredientes y su función.**

Las materias primas utilizadas en la elaboración del pan son: harina, agua, sal, levadura y otros componentes. Evidentemente la utilización de las 4 primeras conduce a la elaboración de pan común, la ausencia de alguna de ellas o la inclusión de algún componente especial conlleva la elaboración de pan especial (Chavan y Jana 2008).

### **1.3.1 Harina**

La denominación harina, sin otro calificativo, designa exclusivamente el producto obtenido de la molienda del endospermo del grano de trigo limpio. Si se trata de otros granos de cereales o de leguminosas hay que indicarlo, por ejemplo: harina de maíz, harina de cebada, etc. Si en la harina aparece no sólo el endospermo, sino todos los componentes del grano se denomina harina integral o harina de grano entero (Giannou et. al 2003 ; Chavan y Jana 2008).

La harina es el ingrediente más importante en la elaboración de pan porque modula las características específicas de los productos de panadería. Consiste en proteínas, almidón y otros carbohidratos, cenizas, fibras, lípidos, agua y pequeñas cantidades de vitaminas, minerales y enzimas (Giannou et. al 2003 ; Chavan y Jana 2008).

Los dos tipos básicos de proteínas que contiene la harina de trigo son la gliadina y la glutenina, proteínas insolubles que en conjunto (una vez hidratadas y habiendo aplicado fuerza mecánica) reciben el nombre de gluten, las cuales, al humedecerse (durante la preparación de la masa) forman una red cohesiva y elástica, que le da al trigo sus propiedades funcionales. Según la estructura primaria, las subunidades de glutenina se han dividido en subunidades de alto peso molecular (HMW) (PM 67000 a 88000) y subunidades de bajo peso molecular (LMW) (PM 32000 a 35000). Las gluteninas nativas están compuestas por un esqueleto formado por polímeros de subunidades de HMW y polímeros de subunidades de LMW ramificados a partir de subunidades de HMW. Los enlaces no covalentes, como los enlaces de hidrógeno, los enlaces iónicos y los enlaces hidrofóbicos, son importantes para la agregación de gliadinas y gluteninas e inciden en la estructura y las propiedades físicas de la masa. La cantidad y calidad de las proteínas del gluten determinan en gran medida los requisitos de mezclado de la masa y la sensibilidad al sobremezclado. Además, determinan las propiedades reológicas de la masa mezclada de manera óptima (figura 6) y, como tales, contribuyen a las propiedades de retención de gas de la masa fermentada. Las propiedades de retención de gas, a su vez, determinan el volumen de la barra y la estructura de la miga del pan resultante (Giannou et. al 2003 ; Chavan y Jana 2008; Rupesh y Shraddha, 2011; Amador, 2018).

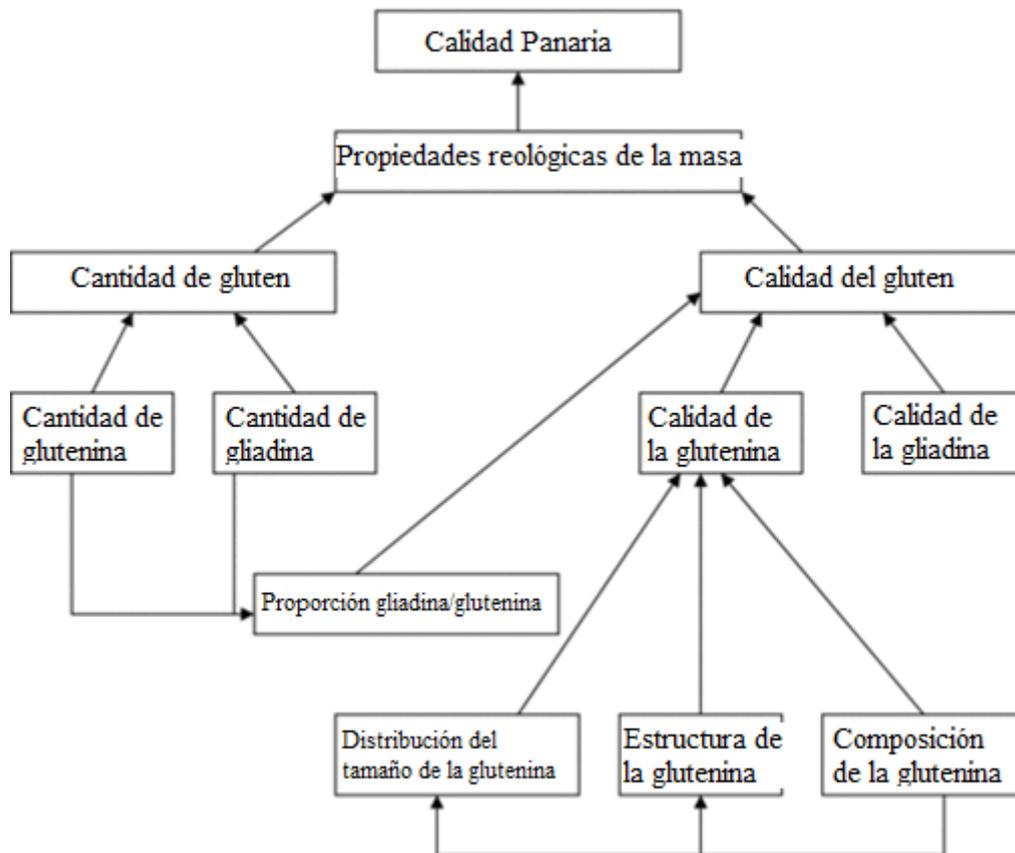


Figura 6. Factores que rigen la calidad de la panificación y las propiedades reológicas de la masa de trigo (Veraverbeke y Delcour, 2002).

### **1.3.2 Agua**

El agua es necesaria para la formación de la masa y es responsable de su fluidez. Es el segundo componente mayoritario en la elaboración de pan y se utiliza para la disolución de sal y azúcares, ayuda a la dispersión de células de levadura y en su desarrollo para llevar a cabo la fermentación, hace posible el amasado de la harina, se requiere para la hidrólisis del almidón y la sacarosa, así como para regular la temperatura de la masa. (Giannou et. al 2003 ; Chavan y Jana 2008)

El agua hidrata la harina facilitando la formación del gluten, con ello y con el trabajo mecánico del amasado se le confieren a la masa características como la cohesión, la elasticidad, y la tenacidad. Además, es importante para la gelatinización del almidón durante el horneado y contribuye al inflado en el horno a través de la vaporización (Callejo, 2002).

### **1.3.3 Sal**

El cloruro de sodio se considera un ingrediente con un papel funcional en la producción de muchos productos de panadería. Es importante dado que refuerza el gluten (inhibe la acción de las proteasas de la harina, que de otro modo despolimerizarían las proteínas del complejo del gluten), actúa como regulador de la fermentación controlando la acción de la levadura y, por lo tanto, nivelando el volumen de la hogaza, favorece la coloración de la corteza durante la cocción y aumenta la capacidad de retención de agua en el pan (Giannou et. al 2003 ; Chavan y Jana 2008).

Una pequeña cantidad de sal en la masa mejora el sabor y favorece la acción de las amilasas ayudando a mantener un suministro de maltosa como alimento para la levadura. La cantidad de sal a utilizarse varía con el tipo de pan que se desea producir de acuerdo a la formulación. El porcentaje se encuentra entre el 1% y el 2.5% (Chavan y Chavan, 2011).

### **1.3.4 Levadura**

En panadería se llama levadura al componente microbiano aportado a la masa con el fin de hacerla fermentar de modo que se produzca etanol y  $CO_2$ . *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más utilizada en la elaboración de pan. Las células de levadura metabolizan los azúcares fermentables (glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa) en condiciones anaeróbicas produciendo dióxido de carbono ( $CO_2$ ) como producto de desecho, el cual queda atrapado en la masa y actúa como un agente leudante y mejora el volumen de la masa. A este fenómeno se le denomina levantamiento de la masa (Giannou et. al 2003 ; Chavan y Jana 2008).

#### **1.3.4.1 Tipos de levadura utilizados en panificación**

- Levadura natural o levadura de masa: se prepara a partir de la microbiota de la propia harina. Para ello, en 3 ó 4 etapas sucesivas, se mezclan harina y agua, se amasa y se deja reposar para que fermente de modo espontáneo. Poco utilizada en la actualidad como levadura única, salvo en elaboraciones artesanales muy concretas, tiene su

principal aplicación en la elaboración de la masa madre empleada en el sistema de elaboración mixto.

- Levadura comercial o levadura de panadería: se prepara industrialmente a partir de cultivos puros generalmente de *Saccharomyces cerevisiae*. Se comercializa de distintas formas: prensada, líquida, deshidratada activa o instantánea, en escamas, etc. Tiene aplicación en todos los sistemas actuales de elaboración de pan.
- Levaduras químicas o impulsores de masas: son aditivos gasificantes que básicamente consisten en la mezcla de un ácido y un compuesto alcalino que con el amasado y el calor de la cocción reaccionan generando  $CO_2$ . Su aplicación real corresponde más a la pastelería que a la panificación (Pérez *et al.*, 2001; Giannou *et. al* 2003 ; Chavan y Jana 2008).

### **1.3.5 Otros componentes del pan**

- Pueden ser simples aditivos o coadyuvantes tecnológicos que se emplean en baja proporción y cuyo único objetivo es favorecer el proceso tecnológico de elaboración del pan. En este caso se les denomina mejorantes y su empleo no significa que el pan elaborado sea un pan especial. Por otro lado, dependiendo del país en el que es elaborado el producto, existe una lista de aditivos permitidos, para fines de esta investigación, se incluyen algunos de los que por ley, de acuerdo a la NOM-247-SSA1-2008 se permiten en México (Tabla 2). Entre los más comunes: harina de habas, harina de malta, leche en polvo, ácido ascórbico, enzimas, etc. (Giannou *et. al* 2003 ; Chavan y Jana 2008).
- Otros ingredientes. Entre sus objetivos se encuentran: aumentar el valor nutritivo del pan o bien proporcionar un determinado sabor (Tabla 1). Su empleo da siempre panes especiales. Entre los más comunes: azúcares, leche, materias grasas, huevos, frutas, etc. (Miralbés, 2000).

Tabla 1. Otros ingredientes del pan y su función (Zanella, 2014).

Ingrediente	Función
Endulzantes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sustrato para la levadura.</li> <li>- Aporte de sabor.</li> <li>- Aporte de coloración de la corteza del pan debido a la caramelización.</li> </ul>
Grasas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- lubricante</li> <li>- Aireadora (captura el aire en forma de pequeñas burbujas)</li> </ul>
Lácteos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mejora coloración de la corteza (caramelización de la lactosa)</li> <li>- Mejor consistencia de la masa (sales minerales fortifican el gluten)</li> <li>- Aporte de sabor</li> </ul>

Tabla 2. Ejemplos de aditivos permitidos en la elaboración de productos de panificación (NOM-247-SSA1-2008).

Función	Ejemplos
Acentuadores de sabor	Ácido glutámico, cloruro (de potasio o sodio), glutamato de (calcio, magnesio, monoamónico, monopotásico, monosódico), etilmaltol, maltodextrinas, sacarosa, etc.
Acondicionadores de masa	Ácido ascórbico y sus sales de sodio y calcio, carbonato de calcio, cloruro de amonio, dióxido de silicio, fumarato de (calcio, sodio o potasio), lactato de sodio o calcio, etc
Antioxidantes	Ácido (ascórbico, fosfórico, isoascórbico), lecitina, terbutilhidroquinona (TBHQ), etc.
Colorantes	Amarillo 2G, amarillo ocazo FCF, tartrazina, beta caroteno, caramelo clases I, II y III, etc.
Conservadores	Ácido benzoico y sus sales de sodio, ácido propiónico y sus sales de sodio o calcio, sorbato de (calcio, potasio y sodio), etc.
Emulsivos, estabilizadores, espesantes y gelificantes	Almidones modificados, carragenina, dextrinas, goma arábiga, goma de Algarrobo, monoestearato de sorbitán, pectinas, etc.
Gasificantes o polvos	Ácido tartárico, bicarbonato de sodio, fosfato monobásico de

para hornear	calcio, pirofosfato ácido de sodio, etc
Humectantes	Alginato de propilenglicol, glicerina, propilenglicol.
Reguladores de pH	Acetato de sodio, ácido láctico, carbonato de calcio, etc.

# Capítulo 2

## Panificación con masa madre.

El empleo de masa agria o masa madre para la fabricación del pan es una práctica panadera muy antigua, ampliamente utilizada en varios países. Desde tiempos inmemoriales la masa madre ha sido conocida por su capacidad de mejorar la calidad y la conservación del pan. La masa madre aporta una microbiota y unos principios activos (enzimas, ácidos orgánicos) que confieren la vitalidad fermentativa y la acidez necesaria a la masa para asegurar la buena marcha del proceso de panificación (Bernabé et al., 2007).

Los ácidos orgánicos producidos afectan al gluten y a las fracciones del almidón. Adicionalmente, la disminución del pH asociada con la producción de ácidos causa un incremento de la actividad de las proteasas y amilasas, evitando el envejecimiento (Bernabé et al., 2007).

Además de mejorar la textura del pan, la fermentación de la masa madre tiene como resultado un incremento de la biodisponibilidad de los minerales presentes y una reducción del contenido de fitato. Estos datos, hacen que el uso de la masa madre esté muy indicada en los panes integrales por su contenido en fitatos que limitan la absorción mineral por el organismo (Bernabé et al., 2007).

### **2.1 Generalidades.**

#### **2.1.1 Definición**

La definición de masa madre hace referencia a " una masa elaborada con harina de trigo y/o centeno y agua (la sal en pequeñas dosis) que se ha dejado fermentar de forma natural, procediéndose a diversos refrescos con el fin de incrementar la microbiota natural que contiene la propia harina y poder así fermentar (subir) la masa" (Bernabé et al., 2007).

Los microorganismos implicados son:

- Bacterias lácticas. Se presentan dos tipos: bacilos (*Lactobacillus* como *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*) y cocos (*Leuconostoc*, como *L. mesenteroides*, entre otros), que funcionan como acidificantes.
- Levaduras. Esencialmente se encuentran las del género *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*) (Bernabé et al., 2007).

### **2.1.2. Preparación.**

La preparación de una masa madre se suele realizar amasando harina, agua y una porción de masa de una hornada anterior. Posteriormente esta masa resultante se vuelve a amasar de forma idónea con agua y harina. La masa así obtenida, fermentada adecuadamente, se utiliza para elaborar pan o "se refresca", amasándola nuevamente hasta su posterior utilización. Durante este tiempo tienen lugar fenómenos de fermentación (formación de anhídrido carbónico, alcohol, ácidos orgánicos, aldehídos y cetonas) y fenómenos de reproducción de microorganismos, sobre todo levaduras y bacterias ácido-lácticas (Bernabé et al., 2007).

### **2.2. Panificación con masa madre.**

La masa madre se utilizó como agente leudante en la producción de pan hasta que fue reemplazada por la levadura de panadería en el siglo XIX; a partir de entonces su uso se redujo al pan artesanal y de centeno. La masa madre de trigo se utiliza en más del 30% de los productos de panadería italianos (Corsetti y Settani, 2007).

El pan obtenido con masa madre y dosis bajas de levadura prensada (0.5 %) reúne unas características organolépticas y de conservación muy apreciadas. Sin embargo, la elaboración de masas madre (Figura 7) implica un control preciso de sus características, un tiempo de elaboración y una mano de obra calificada. A medida que la masa madre se ha ido sustituyendo por el uso de mejorantes panarios y dosis más altas de levadura prensada (sistema directo), con el fin evitar la laboriosa elaboración de la masa madre y de acortar el tiempo de fermentación, la calidad del producto resultante se ha visto reducida ostensiblemente (Bernabé et al., 2007).

En la actualidad, la industria panadera se centra en la aplicación de tecnologías que conllevan a mejorar las características organolépticas, calidad y vida útil del pan. Debido a eso, se busca regresar a la elaboración tradicional y uso de masas madres. La masa madre es un producto intermedio entre la preparación del pan y la masa; contiene agua, harina y microorganismos metabólicamente activos tales como bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras. Durante la fermentación de la masa, los microorganismos, mejoran las características organolépticas y propiedades del pan, incluyendo su vida útil, valor nutricional y beneficio a la salud (Guerrero, 2019).

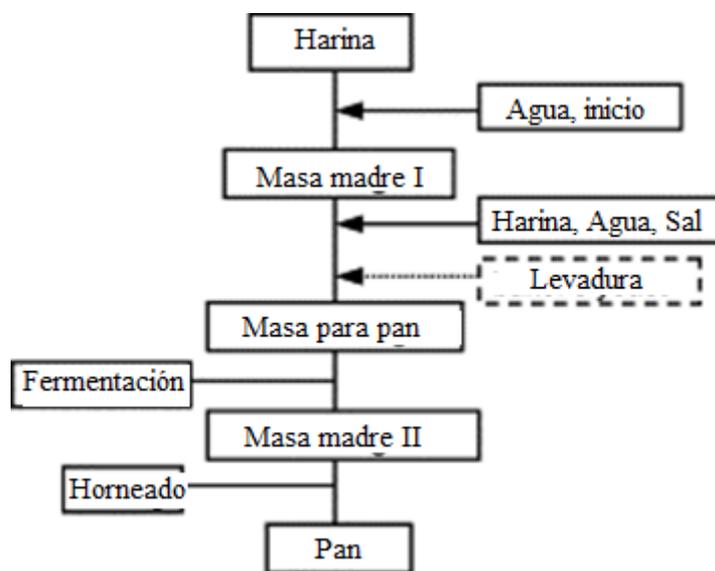


Figura 7 . Breve esquema de producción de pan de masa madre (Guerrero, M. 2019).

Además, la fermentación de la masa madre afecta la reología de la masa en 2 niveles, en la propia masa madre y en la masa madre que contiene masa de pan. En la masa, la fermentación disminuye la elasticidad y la viscosidad, mientras que la adición de masa madre a la masa de pan final da como resultado una masa menos elástica y más suave (Clarke et al., 2004).

Actualmente, existe un gran consenso en recuperar el aroma y sabor que comunica una buena masa madre, así como de mejorar la conservación del pan. En los últimos años han aparecido en el mercado numerosos sustitutos de las masas madres naturales. Así, se pueden encontrar formulaciones de ingredientes que comunican acidez a la masa, masas madres deshidratadas

inactivas y masas madres activas que van a proporcionar alguna de las características que comunica la masa madre natural (Bernabé et al., 2007; Corsetti y Settanni, 2007; Guerrero, M. 2019).

### **2.2.1. Influencia de la masa madre sobre las características de la masa panaria.**

#### **2.2.1.1 Características Reológicas.**

Ensayos realizados en el farinógrafo, alveógrafo y extensógrafo nos informan que al adicionar masa madre:

- El tiempo de amasado se reduce (medido en farinógrafo).
- Disminuye la tenacidad y reduce la extensibilidad de la masa (medido en alveógrafo).
- Aumenta la energía total absorbida al estirar la masa (medido en extensógrafo) (Bernabé et al., 2007).

#### **2.2.1.2 Características fermentativas.**

Al adicionar la masa madre a la masa panaria se producen los siguientes resultados:

- Aumenta el volumen de gas producido.
- Aumenta el volumen de gas retenido en la masa.
- Incrementa el volumen final en el horno.
- En consecuencia, se obtiene un pan de mayor volumen (Bernabé et al., 2007).

### **2.3. Propiedades de la masa madre.**

Muchas propiedades inherentes de la masa madre dependen de las actividades metabólicas de sus BAL residentes (fermentación láctica, proteólisis y síntesis de compuestos volátiles), factores endógenos en los productos de cereales (carbohidratos, fuentes de nitrógeno, minerales, lípidos y ácidos grasos libres, y actividades enzimáticas) y parámetros del proceso (temperatura, rendimiento de la masa [DY], oxígeno, tiempo de fermentación y número de pasos de propagación de la masa madre) (Chavan y Chavan, 2011).

### **2.3.1. Rendimiento de masa**

La masa madre puede variar en su consistencia. La fermentación de la masa madre se puede realizar como masa firme o como suspensión líquida de harina en agua. Esta proporción entre harina y agua se llama DY (por las siglas de *dough yield*) y se define como:

$$DY = \frac{(Cantidad\ de\ harina + Cantidad\ de\ agua)(100)}{Cantidad\ de\ harina}$$

El valor DY de una masa madre influirá significativamente en el perfil de sabor de la masa madre. Cuanto más firme es la masa madre (menor valor de DY), se produce más ácido acético y menos ácido láctico. La tasa de acidificación también está influenciada por el DY de una masa madre, cuanto mayor sea el valor de DY, más rápido se producirá la acidificación, probablemente debido a la mejor difusión de los ácidos orgánicos producidos en el medio ambiente (Chavan y Chavan, 2011).

### **2.3.2. La temperatura**

La temperatura es el factor más importante, ya que influye más en el DY que en la tasa de acidificación además de influir en la composición microbiana de la masa madre. Si se usa el retroceso donde se requiere una parte de la masa madre anterior para inocular la siguiente fermentación, la temperatura juega un papel crítico dado que parte de la microflora se puede perder en los diferentes refrescos de masa madre si no se controla. Las temperaturas óptimas para el crecimiento de lactobacilos son de entre 30 a 40 °C dependiendo de la cepa y para las levaduras de entre 25 a 27 °C. En general, una temperatura más alta, un contenido de agua más alto de la masa madre y la utilización de harina integral mejoran la producción de ácidos en masas madre de trigo (Chavan y Chavan, 2011).

### **2.3.3 Cultivos iniciadores**

Un tercer parámetro es la microbiota utilizada para la fermentación. Los cultivos iniciadores se refieren a preparaciones de uno o varios microorganismos en alta concentración, se aprovechan los productos de su metabolismo que pueden ser enzimas u otras moléculas. Son

importantes porque a nivel industrial pueden reducir los tiempos de fermentación, homogeneizar procesos, potencializar sabores y aromas, y lograr características sensoriales deseables en los productos finales. En este sentido, gracias a que las BAL tienen capacidad hidrolítica, pueden dar pie a la formación de compuestos de aroma y sabor y mejorar las características sensoriales de los productos fermentados, además de inhibir la presencia de algunos patógenos. Se pueden distinguir dos familias principales: las BAL heterofermentativas y las homofermentativas (Cobo et al., 2019).

### **2.3.4 Acidez y pH titulables**

La acidez titulable y el pH de la masa son importantes durante la fermentación de la masa madre. En la fase inicial, tanto la acidez como el pH permanecen constantes, mientras que, durante la fase intermedia, la acidez titulable aumenta debido a la presencia de la levadura. Durante la fase de fermentación a largo plazo, el contenido de levadura disminuye por lo que la acidez titulable y el pH de la masa dependen principalmente de las BAL introducidas en el sistema. Las levaduras presentes en la masa madre están sólo ligeramente influenciadas por el ácido láctico, pero mucho más afectadas por el ácido acético. El pH de una masa madre madura varía según la naturaleza del proceso y el cultivo iniciador utilizado, pero para las masas madre de trigo varía de 3,5 a 4,3. El ácido aumenta la solubilidad de la fracción de glutenina extraída de la harina de trigo y también afecta el poder de hinchamiento del gluten (Chavan y Chavan, 2011).

### **2.3.5. Sustrato**

El sustrato, principalmente harina, utilizado para la fermentación de la masa madre es otro parámetro que influye significativamente en la masa madre. El contenido de cenizas es importante, dado que su contenido en el salvado es aproximadamente 20 veces mayor que el del endospermo. La fracción de salvado contiene más minerales y micronutrientes que son importantes para el crecimiento de BAL. La ceniza también influye en la capacidad amortiguadora del sistema de masa madre que permite alcanzar una mayor acidez titulable total. El número de caída de la harina es un indicador de la actividad amilolítica (fuerza de la

$\alpha$ -amilasa para licuar el gel del almidón) de la harina y es importante en la producción de gas durante la fermentación. Valores inferiores a 300 s en las harinas sugieren una alta actividad de la  $\alpha$ -amilasa, por lo que, en ese momento habrá más azúcares libres disponibles para que crezca la microbiota, indicando una alta eficiencia para fermentar (Magaña et al., 2009; Chavan y Chavan, 2011).

# Capítulo 3

## Tipos de masa madre y productos.

### **3.1 Tipos de Masa Madre**

De acuerdo con la tecnología aplicada (Figura 8), las masas madres se dividen en tres tipos:

#### **3.1.1 Masa Madre Tipo I.**

Masa madre que se reinicia utilizando una parte de la fermentación anterior. Se elaboran con técnicas tradicionales y se caracterizan por realizarles un refresco continuo y así mantener los microorganismos en estado activo.

#### **3.1.2 Masa Madre Tipo II.**

Es un tipo industrial de masa madre, generalmente se utiliza como complementos para agriar la masa durante la preparación del pan, son preparaciones semifluidas que se caracterizan por largos períodos de fermentación (de 2 a 5 días, utilizando cepas adaptadas para iniciarla) y una temperatura de fermentación a veces  $> 30^{\circ} \text{C}$  para acelerar el proceso. Debido a su consistencia, esta masa madre se puede bombear fácilmente en una panadería industrial.

#### **3.1.3 Masa Madre Tipo III.**

Son preparaciones secas que contienen LAB resistentes al proceso de secado. Las panaderías industriales suelen utilizar masa madre de tipo III, que se puede secar, ya que la calidad es constante y ya no hay variaciones en el producto final debido a la masa madre recién producida. Las masas madre Tipo III son las más convenientes para introducir el auténtico sabor del pan en la industria de la panadería de alta tecnología actual.

Se utilizan diferentes técnicas de secado y pasteurización de líquidos, para lograr la estabilidad microbiana; el secado por aspersion y el secado en tambor son las técnicas de secado más comúnmente utilizadas en la producción de masa madre Tipo III.

A diferencia de las masas madres tipo I, las masas tipo II y III requieren de la adición de

levadura panaria (*S. cerevisiae*) como agente de fermentación (Chavan y Chavan, 2011; Corsetti y Settani, 2007; Guerrero, 2019).

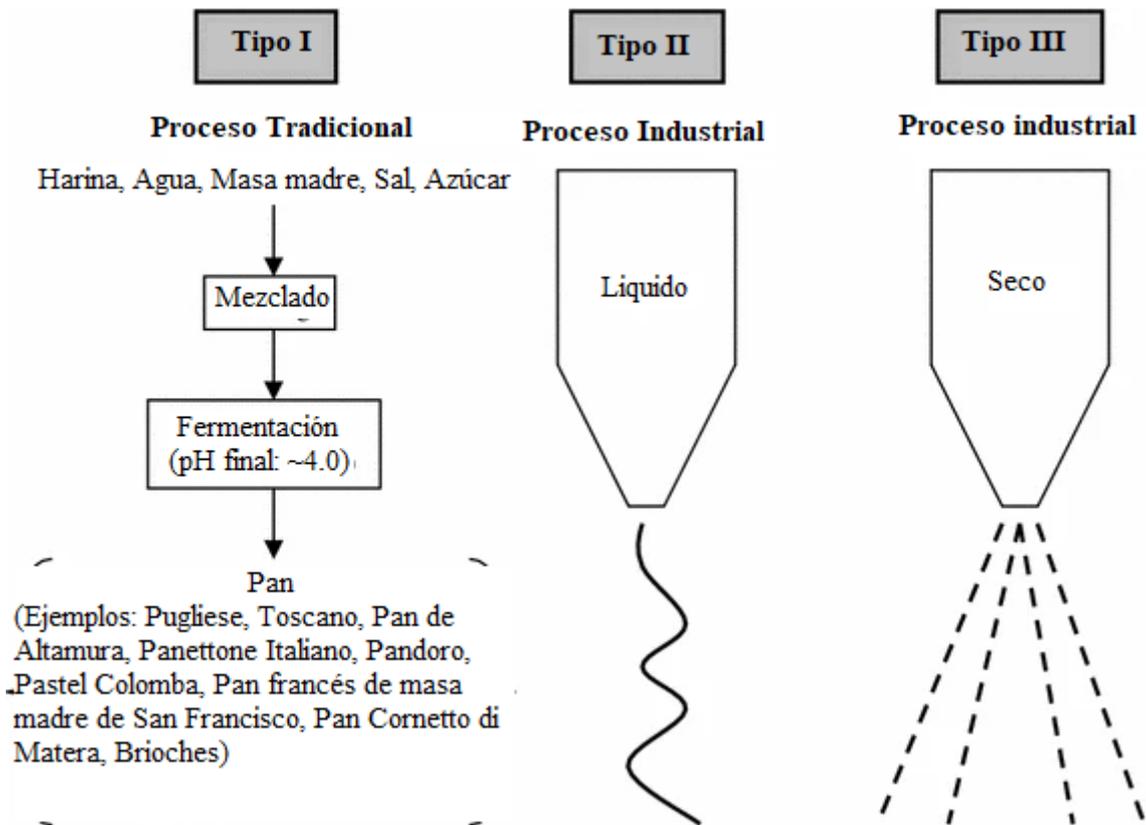


Figura 8. Esquema de los procesos de producción de masa madre (Corsetti y Settani, 2007).

En el secado por atomización, la masa madre líquida se pulveriza en una corriente de aire caliente. El contenido de agua (alrededor del 90%) se evapora, mientras que las gotas de masa madre caen en el aire caliente. Debido a la presencia de agua que se evapora en las gotas calientes que caen, el producto en sí se enfría durante el proceso evitando así que el polvo se oscurezca (Chavan y Chavan, 2011).

En la tecnología de secado por tambor, los cilindros de acero inoxidable se calientan con vapor. Se extiende una fina película de producto sobre el cilindro y se produce una evaporación casi inmediata. El resto del tiempo de residencia del producto semiseco en el tambor se utilizará para permitir las reacciones de Maillard. Dependiendo de la combinación de temperatura / tiempo, la masa madre final puede estar más o menos caramelizada o tostada. Una masa madre de tipo III secada en tambor no solo agrega un sabor a masa madre al producto final, sino que al mismo tiempo también agrega algo de malteado, notas de sabor

caramelizadas e incluso hasta un aroma tostado (Chavan y Chavan, 2011).

Usando los procesos de estabilización anteriores, hay una pérdida de compuestos de sabor volátiles durante la evaporación del agua. Una forma de prevenir esto y lograr propiedades de sabor más completas es mantener la masa madre en forma líquida y estabilizar la masa madre mediante pasteurización o enfriamiento, de esta manera la mayoría de los compuestos volátiles permanecen presentes en el producto. Una ventaja para la aplicación industrial es la capacidad de bombeo de dicho producto, además de ser muy preciso y tener una calidad constante en cualquier momento (Chavan y Chavan, 2011).

### **3.2 Productos elaborados a partir de Masa Madre**

#### **3.2.1 Productos horneados de masa madre salada**

En Europa, Italia es el país líder en elaboración de productos horneados de masa madre, principalmente debido a la larga historia de división política regional, existen alrededor de 200 tipos diferentes de pan que se fabrican en toda Italia. Algunos panes ya han recibido la Denominación de Origen Protegida (DOP) (Pan de Altamura (Figura 9) y Pagnotta del Dittaino) o la Indicación Geográfica Protegida (IGP) (Pan de Matera, Pan Casareccio de Genzano y Coppia Ferrarese). A pesar de las diferencias, casi todos los panes italianos tradicionales / típicos utilizan masa madre (Minervini et. al, 2012, Lattanzi et al., 2013).



Figura 9. Pan de Altamura (D.O.P Italian Food Agency, 2017).

En Irpinia, una gran área de la región de Campania, se producen numerosos panes, los más conocidos de esta zona son Pan de Montecalvo (Figura 10), incluido en los productos alimenticios tradicionales (Decreto Ministerial 1877/2000 Ministerio de Agricultura y Silvicultura), Pan de Calitri y Pan de Iurmano. Se trata de panes elaborados principalmente con harinas de trigo de antiguos cereales locales y, a veces, con la adición de harina de centeno. La levadura natural, los ingredientes, las tradiciones culturales y las condiciones climáticas locales son características distintivas de estos panes (Reale et. al, 2019).



Figura 10. Pan de Montecalvo (Assessorato Agricoltura, 2019).

Entre otros ejemplos de panes elaborados con masa madre se encuentran: Pugliese, Toscano, Pan francés de masa madre de San Francisco, Pan Cornetto di Matera y panes tradicionales franceses (baguettes) (Corsetti y Settani, 2007, Lhomme et al., 2015)

### **3.2.1.1 Pan de San Francisco**

El pan de San Francisco es un pan tradicional en la región de California (Figura 12). Se cree que las cepas son importadas por buscadores de oro franceses y se mantienen desde entonces. *Lactobacillus sanfranciscensis* es el LAB predominante y se encuentra a menudo en simbiosis con la levadura *Candida milleri*, una levadura maltosa negativa muy adaptada al medio ácido. Debido a las propiedades negativas a la maltosa de la cepa de levadura, el LAB puede crecer en maltosa sin competencia. La forma de elaborar el pan tradicional es fermentar la masa madre a muy bajas temperaturas durante mucho tiempo (Figura 11). Se desarrolla un fuerte sabor a ácido acético. Cuando se hace la masa final, se utiliza hasta el 100% de la masa

madre sobre el peso de la harina y se fermenta por segunda vez a baja temperatura (4 °C) durante la noche. A este pan se le forman pequeñas ampollas en la superficie de la masa debido a la alta acidez. Finalmente se hornea el pan con mucho vapor y se obtiene una costra rojiza muy crujiente que muestra los típicos ojos de pescado (Decock y Cappelle, 2005).

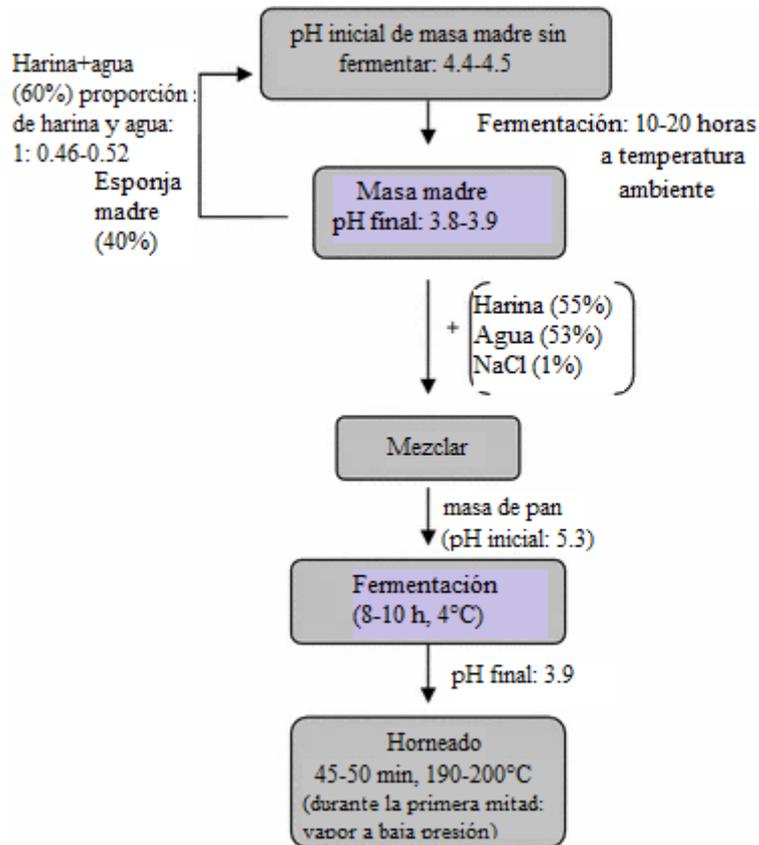


Figura 11. Proceso de producción del pan francés San Francisco (Yazar y Tavman, 2012).

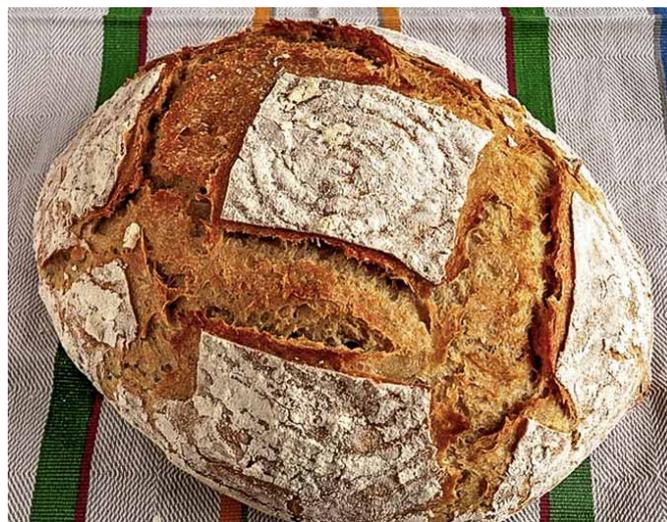


Figura 12. Pan de masa madre de San Francisco (García, 2010).

### **3.2.2 Productos horneados de masa madre dulce**

Varios productos horneados dulces se consumen principalmente con motivo de algunas fiestas religiosas, por ejemplo: Panettone, Pandoro y Nadalin, y Pizza di Pasqua, Panaredda y Colomba para Navidad y Pascua, respectivamente. A pesar de su origen geográfico (Por ejemplo: Lombardy para Panettone), estos productos tienen, en la actualidad, una difusión nacional e internacional (Lattanzi et al., 2013).

Otros productos dulces en donde se hace uso de masa madre son los brioches, bucht, cornish splits, corona de albaricoque, panes con leche, pan de Viena, stollen de Alsacia, bomboloni, chouchou y churros (Ferchichi et al., 2007).

#### **3.2.2.1 Panettone**

El panettone es un pan dulce típico italiano que se consume durante el período navideño (Figura 13). Elaborado con masa madre, a la cual se le realizan hasta siete refrigerios, cada vez introduciendo más azúcar a la masa (Figura 14). De esta manera, la masa madre se adapta al alto nivel de azúcar en la masa final. Se ha realizado una investigación completa de la microflora y se pudo dilucidar la presencia de un LAB de masa madre especial. Esta bacteria, *Leuconostoc mesenteroides*, es capaz de producir un exopolisacárido, llamado dextrano, basado en sacarosa. La unidad de glucosa del azúcar se separa de la fructosa por la actividad sacarasa de la dextransucrasa, expresada por *L. mesenteroides*, en presencia de azúcar. La glucosa se coloca en una cadena, el dextrano, y la fructosa se libera en el medio de crecimiento y puede consumirse o convertirse en manitol (Decock y Cappelle, 2005).



Figura 13. Panettone (Bakerpedia, 2021).

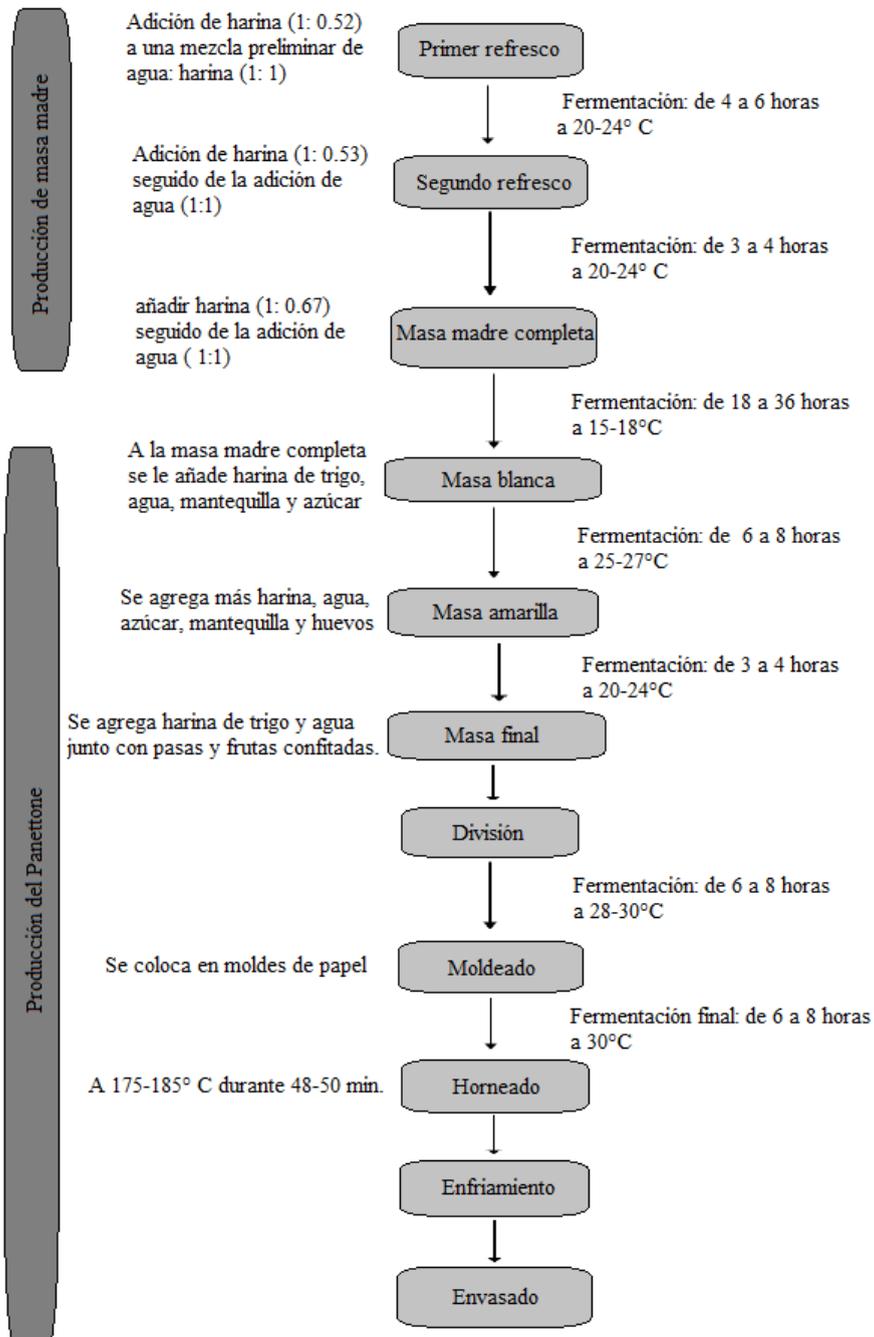


Figura 14. Diagrama de elaboración de Panettone (Bakerpedia, 2021).

### **3.2.3 Galletas de masa madre**

Posteriormente, con una tendencia creciente, las galletas de masa madre (galletas tipo cracker fermentadas) atrajeron el interés en Estados Unidos (Figura 15). En la fabricación de este tipo de galleta (Figura 16) se incluye un largo periodo de fermentación el cual requiere una esponja iniciadora (la esponja contiene cerca del 60 al 70 por ciento de la harina y requiere un

tiempo de fermentación de aproximadamente entre 16 y 19 horas a una temperatura ambiente controlada de 25 - 29°C) durante este tiempo, se producen ácidos provenientes de las bacterias *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum*, así como de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El grado de acidez o pH decrece de 6 a 4, la harina contiene enzimas proteolíticas (con un pH óptimo de 4.1) las cuales durante la fermentación tienen como objetivo modificar las propiedades de la masa, permitiendo que sea más extensible y menos elástica lo que facilita el proceso para convertirla en hojas laminares posteriormente. Después de la fermentación, a la esponja se le adicionan bicarbonato de sodio y sal, el bicarbonato incrementa la alcalinidad (el pH se incrementa a un valor entre 7 y 8) y le da a las galletas de soda su nombre. Después de mezclar nuevamente la masa se fermenta por un periodo adicional de 3 a 6 horas. El alto pH inhibe la producción de más ácido debido a la bacteria pero permite que la fermentación de la levadura continúe. Una vez que la masa es madurada se hacen hojas de alrededor de 4 mm y después son laminadas cerca de 6-8 veces. Las crackers son cortadas haciendo perforaciones en línea a lo largo de la hoja de masa, conservando esta forma son horneadas para disminuir el desperdicio. Una vez horneada la hoja de cracker es dividida a lo largo de la línea de perforaciones dejándolas lista para ser empacada. La textura final es escamosa pero crujiente (Orozco y Guerrero, 2016).



Figura 15. Galleta Cracker Fermentada (Orozco y Guerrero, 2016).

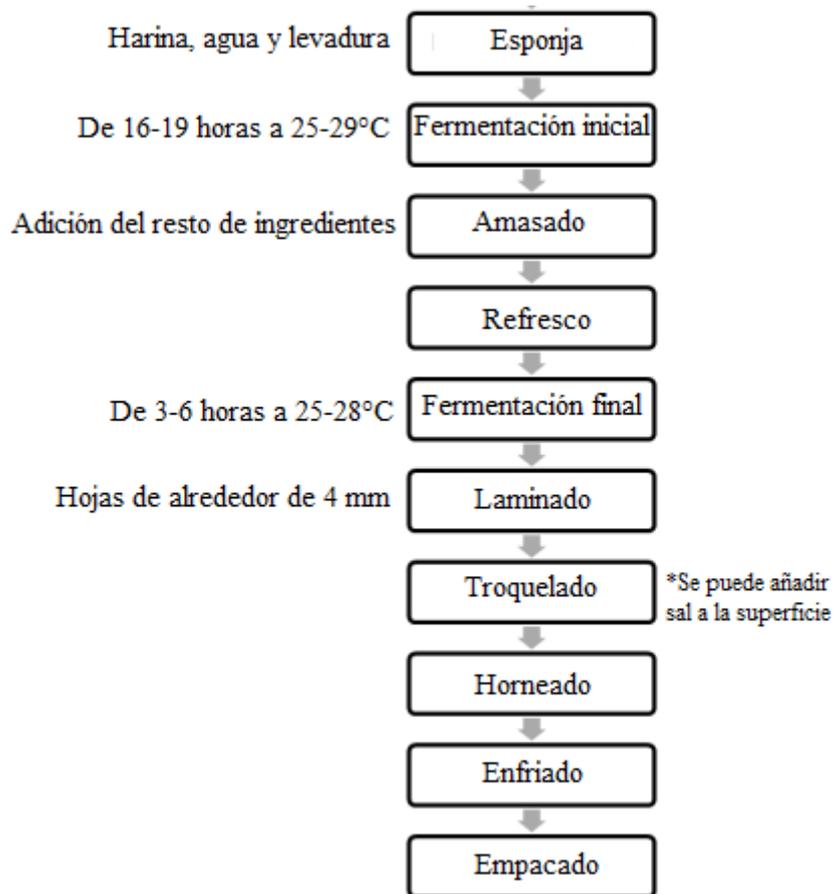


Figura 16. Diagrama de elaboración de galleta fermentada (Orozco y Guerrero, 2016).

### **3.2.4 Otros productos**

En los países asiáticos se encuentran panes de masa madre, como lo son el iraní Barbarí, chino al vapor y Bhatara indio. En África, los panes de masa madre egipcia Balady, Sudanesa Kisra e Injera etíope son algunos de los más populares (Baye et al., 2013, Zhang et al., 2019).

#### **3.2.4.1 Producción de pan de centeno**

En Europa, los estudios realizados en Alemania, Bélgica, Escandinavia y el área del Báltico profundizaron principalmente en la tradición del pan de centeno de masa madre (Ua-Arak et al., 2017).

En las panaderías se utiliza una amplia variedad de procesos en la producción de masa madre de centeno. El más utilizado es el '1-Stufen Sauer', que es una masa madre de centeno firme hecha en un solo paso utilizando una pieza de la producción anterior. Durante la mezcla de

una masa de centeno, no se crea una red de gluten (debido a que no contiene, a diferencia del trigo). Los pentosanos juegan un papel clave durante el desarrollo de la masa de centeno. La absorción de agua por los pentosanos aumenta debido a la etapa de acidificación, esta agua se puede liberar durante la cocción hacia el almidón, lo que da como resultado un pan más suave y húmedo. Una segunda función de la masa madre en la producción de pan de centeno es disminuir la actividad de la amilasa presente en la harina de centeno. A diferencia de las amilasas presentes en la harina de trigo, las amilasas de la harina de centeno siguen activas cuando el almidón comienza a gelatinizar durante el proceso de horneado. Cuando la calidad de la harina de centeno es mala, esta actividad de amilasa es tan alta que la miga se hidroliza completamente durante el horneado. Al disminuir el pH de la masa mediante una fermentación de masa madre, se inhiben las amilasas. Otras ventajas son, por supuesto, un sabor mejorado, una vida útil microbiana mejorada, suavidad de la miga, etc. Como regla general para la acidificación adecuada de un pan de centeno, un tercio de la harina de centeno debe añadirse a través de una masa madre (Decock y Cappelle, 2005).

#### **3.2.4.2 Shalgam**

Bebida fermentada bastante popular en el sur de Turquía. Es una bebida turbia de color rojo que se produce generalmente de forma casera pero también mantiene una producción industrial (Erten et al., 2008). Las diferentes técnicas utilizadas en la producción dan lugar a diferencias en la estabilidad y calidad del producto (Altay et al., 2013). Hay dos pasos de fermentación en la producción tradicional de shalgam. El primer paso se define como fermentación de masa madre y se realiza con la masa que se obtiene de mezclar agua, sal, harina de bulgur y masa madre. Se deja fermentar a 25 ° C durante un periodo de 3 a 5 días, posteriormente se extrae la masa con agua cuatro veces y la extracción se traslada al tanque de fermentación donde ocurrirá la segunda fase (fermentación de zanahoria). Durante este segundo proceso se agregan sal, agua y zanahorias y se deja fermentar a 25 ° C durante un lapso de 3 a 10 días. Después de la fermentación, el producto se filtra y se transfiere a botellas para después almacenar a 4 ° C (Üçok y Tosun, 2012; Altay et al., 2013).

#### **3.2.4.3 Boza**

Es un producto tradicionalmente fermentado que tiene una estructura viscosa, un característico sabor agridulce, olor a alcohol y ácido y un color amarillo claro. Se produce a

partir de cereales como arroz, trigo, maíz, avena y centeno. Después de que los cereales se cuecen en agua, se agrega azúcar y las levaduras comienzan la fermentación del ácido láctico (Levent y Cavuldak, 2017; Soyuçok y Başığit Kılıç, 2017). Un cultivo iniciador puede provenir de boza, yogur o masa madre, consiste en levaduras y *Lactobacillus* spp., (Altay et al., 2013). Los productos de la fermentación son el ácido láctico y el CO<sub>2</sub>, lo que aporta al producto una característica refrescante y su sabor característico (Levent y Cavuldak, 2017). La diferencia en el tipo y proporción de cereales y las condiciones de fermentación pueden conducir a la producción de diferentes tipos de composición de boza. Aunque la cerveza y la boza son productos diferentes en cuanto a características del producto y métodos de producción, la boza es reconocida como la cerveza más antigua. Boza se diferencia de la cerveza por la baja composición de alcohol etílico (<2%) y la fermentación del ácido láctico además de la fermentación alcohólica (Levent y Cavuldak, 2017). Boza ha sido producido por los turcos de Asia Central desde la antigüedad. Después de que los turcos emigraron a las diversas regiones de Asia Central, introdujeron la boza a la población local y contribuyeron a su difusión a las diferentes regiones. Boza, que es una bebida tradicional turca, es conocida por los Balcanes, Krym, Caucasia, Asia Central y Egipto (Levent y Cavuldak, 2017).

# Capítulo 4

## Microbiota y metabolitos de la masa madre. Métodos para su estudio.

Las masas madre son ecosistemas biológicos muy complejos debido a la composición microbiana y todos los efectos interactivos entre los procesos e ingredientes de panificación. La fermentación de masas madre están dominadas por BAL específicamente adaptadas que se producen en cantidades superiores a  $10^8$  UFC / g, que pueden coexistir o posiblemente en simbiosis con levaduras típicas cuyos números son órdenes de magnitud inferiores. La mayoría de las especies que se aíslan regularmente de la masa madre o que se utilizan como iniciador de la masa madre pertenecen, con pocas excepciones, a uno de los siguientes cuatro géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Weissella*. El mayor número de especies diferentes (> 23 especies) se encuentra en el género *Lactobacillus*. La mayoría de las levaduras que se encuentran en las masas madre se han asignado a las especies *Candida milleri*, *C. holmii*, *S. exiguous* y *S. cerevisiae* (Chavan y Chavan, 2011.; Vogel et al., 2002).

### 4.1 Lactobacillus

Los lactobacilos son uno de los géneros de bacterias ácido lácticas más importantes y más utilizados en la producción de alimentos fermentados y están ganando cada vez más atención en el área de los probióticos. Los lactobacilos son bacterias Gram positivas, generalmente más resistentes a las condiciones ácidas, que otras bacterias lácticas, siendo capaces de crecer a valores de pH de hasta 4, lo que les permite mantenerse en crecimiento en fermentaciones naturales aún en etapas tardías. El género *Lactobacillus* es heterogéneo, sus miembros pueden tener un contenido de 33-35% de G+C en el ADN, se encuentran en una variedad de nichos ambientales, incluyendo la masa madre (Tabla 3) (Castañeda, 2017).

Tabla 3. Especies de *Lactobacillus* generalmente asociadas con la fermentación de la masa madre o que se encuentran en la masa madre fermentada (Chavan y Chavan, 2011).

Obligatoriamente heterofermentativo	Facultativamente heterofermentativo	Obligatoriamente homofermentativo
<i>Lb. acidifarinae</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. amylovorus</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
<i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	<i>Lb. delbrueckii subsp. delbrueckii</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. paralimentarius</i>	<i>Lb. farciminis</i>
<i>Lb. fructivoros</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. mindensis</i>
<i>Lb. frumenti</i>		<i>Lb. crispatus</i>
<i>Lb. hilgardii</i>		<i>Lb. johnsonii</i>
<i>Lb. panis</i>		<i>Lb. amylolyticus</i>
<i>Lb. pontis</i>		
<i>Lb. reuteri</i>		
<i>Lb. rossiae</i>		
<i>Lb. sanfranciscensis</i>		
<i>Lb. siliginis</i>		
<i>Lb. spicheri</i>		
<i>Lb. zymae</i>		

#### **4.2 Pediococcus**

El género *Pediococcus* fue descrito por primera vez por Wochnschere F. Balcke en 1884, se trata de un grupo bacteriano que presenta un intervalo amplio de valores de G+C (34-42%), pertenece a la familia *Lactobacillaceae*, son cocos no móviles de 1.0-2.0 µm de diámetro con una morfología de tétrada, catalasa negativa, pueden ser clasificados como aerotolerantes. Todas las especies crecen en presencia de un 5% de NaCl, no reducen nitratos y no forman indol a partir de triptófano, fermentan la glucosa por la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas y forman ya sea D- o L- lactato sin la producción de dióxido de carbono. Crecen a una temperatura óptima de 25-40°C y a un pH óptimo de 6.0-6.5. El género *Pediococcus* se puede

encontrar en alimentos ricos en proteínas como carnes frescas y curadas, embutidos crudos, así como en embutidos fermentados. Las bacteriocinas producidas por el género *Pediococcus* son conocidas como pediocinas, y han sido estudiadas ampliamente para la bioconservación de alimentos (Saucedo, 2017; Contreras, 2020).

Las especies de este género más utilizadas comercialmente como cultivos iniciadores son *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*. Éstas participan en la fermentación de vegetales y carnes, en ensilados y en la producción de quesos; además han sido utilizadas como probióticos o promotores de crecimiento biológico en alimentación animal. Específicamente en la fermentación de productos cárnicos o lácteos, la actividad proteolítica que tienen estas bacterias resulta fundamental para garantizar la producción de los sustratos específicos (Contreras, 2020).

#### **4.3 Leuconostoc**

El género *Leuconostoc* está compuesto por microorganismos Gram positivos, catalasa negativos, con morfología cocoide irregular. Filogenéticamente, *Leuconostoc* pertenece al filum de los *Firmicutes*, clase *Bacilli* y orden *Lactobacillales*. *Leuconostoc* está estrechamente relacionado con los géneros *Oenococcus* y *Weissella*, juntos se les conoce comúnmente como el “grupo *Leuconostoc*” de las BAL (Castañeda, 2017).

Particularmente, *Leuconostoc mesenteroides* está ampliamente presente en alimentos fermentados como la carne, los granos de cacao, el kimchi, las aceitunas, el vino y algunos productos lácteos. *Leuconostoc pseudomesenteroides* se encuentra en cultivos indicadores en asociación con los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc*, su presencia es beneficiosa en numerosos aspectos tecnológicos (Castañeda, 2017).

#### **4.4 Weissella**

Son bacterias Gram positivas, catalasa negativa, no formadoras de esporas, heterofermentativas, inmóviles, presentan dos estados morfológicos: bacilar o cocos ovoides. En la actualidad hay más de 18 especies de este género, siendo *Weissella paramesenteroides* una de las especies predominantes en verduras frescas y que juega un papel importante en el

ensilaje. *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica* y *Weissella viridescens* se han asociado comúnmente con la carne o productos cárnicos. *Weissella confusa* ha sido aislada de una gran variedad de fuentes como caña de azúcar, jugo de zanahoria, leche cruda, aguas residuales, embutidos fermentados y alimentos típicos de Malasia (Castañeda, 2017).

Dentro del género *Weissella* se han investigado algunas especies por su potencial como productores de bacteriocinas mostrando inhibición contra *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. Se han reportado cepas capaces de inhibir la adherencia de *Helicobacter pylori* a las células del intestino (Castañeda, 2017).

#### **4.5 Levaduras**

Las levaduras a menudo se asocian con LAB en la masa madre y la relación levadura / LAB es generalmente de 1: 100. Las levaduras que se encuentran en las masas madre pertenecen a más de 20 especies. Las levaduras típicas asociadas con BAL en masas madre son *S. exiguus*, *C. humilis* (anteriormente descrita como *C. milleri*) e *Issatchenkia orientalis* (*C. krusei*).

Otras especies de levadura detectadas en el ecosistema de masa madre son *Pichia anomala* como *Hansenula anomala*, *Saturnispora saitoi* como *P. saitoi*, *Torulaspora delbrueckii*, *Debaryomyces hansenii* y *P. membranifaciens*. La variabilidad en el número y tipo de especies de levadura en la masa se ve afectada por muchos factores, como la hidratación de la masa, el nivel y el tipo de cereal utilizado, la temperatura de levadura y la temperatura de mantenimiento de la masa madre (Gullo et al., 2003; Succi et al., 2003).

#### **4.6 Vías metabólicas de BAL**

Los carbohidratos disponibles en la harina de trigo son maltosa seguida de sacarosa, glucosa y fructosa, junto con algunos trisacáridos como maltotriosa y rafinosa. La cantidad de glucosa aumenta durante la fermentación, mientras que la sacarosa disminuye en presencia de levaduras debido a la acción de la invertasa. Las levaduras presentes en las masas madre no pueden fermentar la maltosa, un azúcar común en la harina. Sin embargo, las células de levadura pueden desarrollarse debido a la glucosa liberada en el medio por algunas especies

de LAB, en particular *L. sanfranciscensis* (Chavan y Chavan, 2011).

De acuerdo con el metabolismo de los carbohidratos, las BAL se pueden clasificar como homofermentativas y heterofermentativas (figura 17):

Las bacterias ácido lácticas homofermentativas, producen únicamente ácido láctico durante la fermentación (fermentación homoláctica), utilizando la vía metabólica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) al convertir 1 mol de glucosa en 2 mol de ácido láctico, esta vía se caracteriza en la división de la fructosa 1,6-bifosfato con la enzima aldosa en dos fracciones de fosfato triosa que se convierten en lactato. Teóricamente, el rendimiento de esta vía es de dos moléculas de ATP a partir de una molécula de glucosa. Este grupo se conforma por los géneros *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y algunas especies de *Lactobacillus* (Richards, 2017; Ríos y Villanueva, 2019; Saucedo, 2017).

Por otro lado, las bacterias ácido lácticas heterofermentativas, convierten 1 mol de glucosa en 1 mol de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono (fermentación heteroláctica), esta vía también es conocida como Pentosa Fosfocetolasa (PFK) o vía 6-fosfogluconato, las hexosas se convierten en pentosas por la enzima fosfocetolasa; se inicia con la oxidación de la glucosa 6-fosfato a gluconato, seguida de la descarboxilación y división de la pentosa 5-fosfato resultante. Esta vía produce un rendimiento de 1 molécula de ATP por molécula de glucosa. Este grupo de bacterias incluye los géneros *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* y algunas especies de *Lactobacillus* (Richards, 2017; Ríos y Villanueva, 2019).

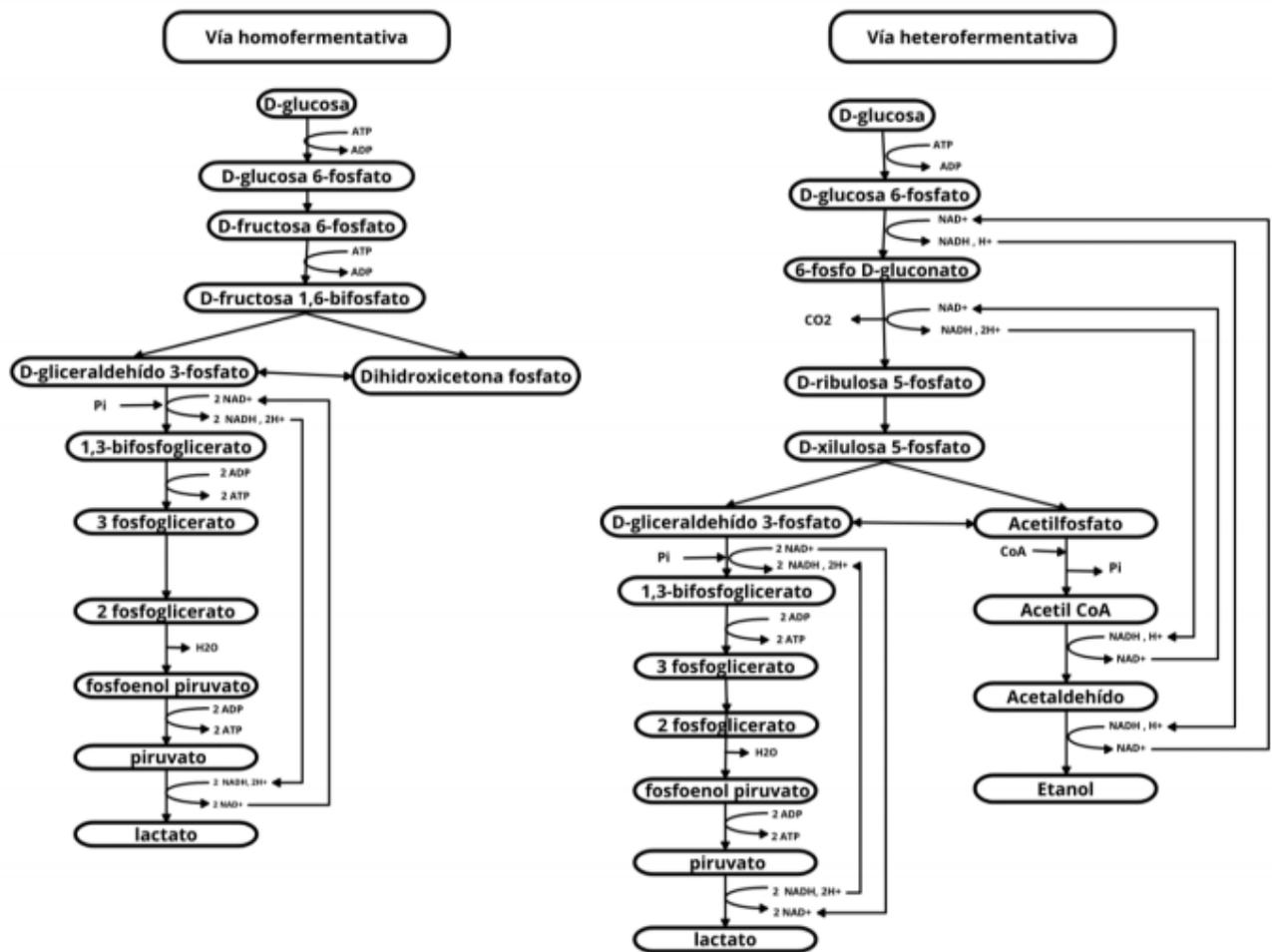


Figura 17. Rutas metabólicas de carbohidratos en BAL (Parra, 2010).

Las hexosas distintas de la glucosa ingresan a estas vías principales al nivel de glucosa-6-fosfato o fructosa-6-fosfato después de la isomerización y / o fosforilación. Los disacáridos se dividen mediante hidrolasas y/o fosfohidrolasas específicas en monosacáridos que luego entran en las vías principales. Las pentosas se fosforilan y se convierten en ribulosa-5-fosfato o xilulosa-5-fosfato mediante epimerasas o isomerasas y posteriormente se metabolizan a través de la mitad inferior de la vía PFK. La utilización de pentosas no está restringida a especies de LAB que poseen una fosfocetolasa constitutiva, la enzima clave de la vía PFK (heterofermentativo obligado); BAL heterofermentativas facultativas, que fermentan la hexosa a través de la glucólisis porque poseen una fructosa-1,6-difosfato aldolasa constitutiva (enzima clave de la glucólisis), fermentan las pentosas de la misma manera que las especies heterofermentativas obligadas. En tales circunstancias, la fosfocetolasa de los LAB heterofermentativos facultativos es inducida por azúcares pentosa disponibles. La fermentación de pentosas da como resultado la producción de cantidades

equimolares de ácido láctico y acético; no se forma  $CO_2$ , y dado que no son necesarios pasos de deshidrogenación para alcanzar el intermedio xilulosa-5-fosfato, el acetilfosfato es utilizado por la acetato quinasa en una etapa de fosforilación a nivel de sustrato, lo que produce acetato y trifosfato de adenosina. Las BAL homofermentativas obligatorias no fermentan las pentosas. Hasta ahora, algunos estudios se han dirigido a la secuenciación del genoma completo de *Lactobacilli*, incluyendo *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* y *Lb. reuteri* que también se encuentran en la masa madre (Chavan y Chavan, 2011; Makarova et al., 2006; Kleerebezem et al., 2004).

#### **4.7 Metabolismo de carbohidratos en LAB**

Las LAB facultativas (por ejemplo, *Lb. plantarum* y *Lb. alimentarius*) y heterofermentativas obligadas (por ejemplo, *Lb. sanfranciscensis* y *Lb. pontis*) que utilizan, respectivamente, las vías Embden - Meyerhof - Parnas y fosfogluconato para la fermentación de hexosa, se encuentran comúnmente en masa madre. Además de estas rutas de energía principales, las respuestas fenotípicas a condiciones de nutrientes bajos y variables implican el uso de aceptores externos de electrones, el uso jerárquico y/o simultáneo de varias fuentes de energía (a menudo junto con sistemas de absorción inducible), y las interacciones con enzimas endógenas y exógenas. Durante la ruta del fosfogluconato, la actividad de la acetato quinasa puede generar energía adicional que, en presencia de aceptores de electrones, permite el reciclaje de  $NAD^+$  sin la necesidad de formación de etanol. Las cofermentaciones son alternativas metabólicas que permiten que las BAL de la masa madre utilicen sustratos no fermentables, aumentando así su adaptabilidad. Se observó un cometabolismo de citrato y maltosa o glucosa en *Lb. sanfranciscensis*. En el proceso de cofermentación, se consumieron preferentemente pentosas en lugar de maltosa. La formación de piruvato y lactato también puede derivar del uso obligatorio de una variedad de sustratos no convencionales como los aminoácidos. La serina se desamina a amoníaco y piruvato, que se reduce a lactato. El piruvato se produce directamente (a partir de alanina) o indirectamente (a partir de aspartato) por transaminación. La degradación del lactato durante la fermentación de la masa madre puede tener un impacto en el sabor y la textura de la masa madre debido a la formación de acetato y  $CO_2$  (Chavan y Chavan, 2011; Liu, 2003).

#### **4.8 Metabolismo de compuestos nitrogenados en LAB**

Está bien establecido que casi todas las BAL tienen auxotrofia múltiple (4 a 14 aminoácidos), por tanto, dependen de sistemas proteolíticos que permiten la degradación de proteínas. El sistema proteolítico consiste en una serina-proteinasa localizada extracelularmente, sistemas de transporte específicos para di/tripéptidos y oligopéptidos (> 3 residuos de aminoácidos) y una multitud de peptidasas intracelulares. Generalmente, las enzimas proteolíticas (proteasas) se agrupan en proteinasas y peptidasas. Las proteinasas catalizan la degradación de proteínas en fracciones de péptidos más pequeñas; las peptidasas hidrolizan enlaces peptídicos específicos o descomponen completamente los péptidos en aminoácidos. La actividad proteolítica de las harinas de trigo y centeno es atribuible principalmente a las proteinasas aspárticas y carboxipeptidasa (Tabla 4), con ambos grupos de proteasas activos en condiciones ácidas (Calderon et al.; 2003).

Tabla 4. Principales grupos de proteasas de los granos de trigo en reposo y germinados (Loponen, 2006).

Tipo de proteasa	Harina de trigo		Malta de trigo			
	Proteinasa aspártica	Serina carboxipeptidasa II	Proteinasa de cisteína	Serina proteinasas	Metaloproteinasa	Serina carboxipeptidasas I a V
Localización	Endospermo	Endospermo	Aleurona, germen	Endospermo, germen	Germen	Aleurona, germen, endospermo
rango de pH	3 a 4.5	4 a 6	4 a 6	5 a 7.5	n.d.	4 a 6
Especificidad	Escinde entre aminoácidos hidrofóbicos	Libera aminoácidos aromáticos	Amplia especificidad	n.d.	n.d.	Amplia especificidad, especificidad pralin
Actividad contra proteínas del gluten.	+, Gluteninas	Opera en conjunto con proteinasas	+	+	n.d.	Opera en conjunto con proteinasas

n.d= no determinado.

La degradación de las proteínas de trigo y centeno es de crucial importancia para el sabor, el volumen y la textura del pan. Las proteínas del gluten, las gluteninas y las gliadinas son las principales proteínas de almacenamiento del grano de trigo. Las gliadinas son proteínas solubles en alcohol del grano de trigo y las gluteninas son solubles en ácidos diluidos. Las gluteninas son proteínas altamente poliméricas que se dividen en fracciones de alto peso molecular (HMW) y de bajo peso molecular (LMW). Las gliadinas son monoméricas ya que solo contienen enlaces disulfuro intramoleculares. Las gliadinas se agrupan en gliadinas de tipo  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\omega$  según su composición de aminoácidos. Las  $\alpha$  y  $\gamma$ -gliadinas, pero no las  $\omega$ -gliadinas, contienen residuos de cisteína. Las principales proteínas de almacenamiento del centeno son las secalinas solubles en alcohol. Las secalinas se dividen en  $\gamma$ -secalinas,  $\omega$ -secalinas y secalinas HMW (Chavan y Chavan, 2011).

En general, se observa que un grado limitado de proteólisis durante todas las fermentaciones de masa madre mejora de manera beneficiosa el sabor del pan sin efectos adversos sobre la textura y el volumen. Los aminoácidos y péptidos afectan el sabor de los alimentos fermentados y, en particular, son importantes precursores de compuestos aromatizantes volátiles. Los aminoácidos sirven como sustratos para las conversiones microbianas o se convierten en compuestos de sabor durante el horneado; en consecuencia, un grado limitado de proteólisis durante la fermentación mejora el sabor del pan. El olor de la miga del pan está determinado principalmente por productos de fermentación microbiana, mientras que los productos de sabor y aroma que se originan en reacciones térmicas dominan en la corteza (Kirchhoff y Schieberle 2001; Thiele et al., 2002; Chavan y Chavan, 2011).

El efecto de la acidificación y de las proteinasas de trigo endógenas, que tienen un pH óptimo de 3,0 a 4,0, se considera importante para la proteólisis en la masa, especialmente para fermentaciones de masa madre de larga duración. La actividad proteolítica específica de las LAB también puede contribuir a la proteólisis. La acidificación microbiana y la reducción de los enlaces disulfuro en las proteínas del gluten por lactobacilos heterofermentativos aumentan la solubilidad de las proteínas del gluten y las hacen más susceptibles a la degradación proteolítica. La hidrólisis de péptidos (proteólisis secundaria) por los lactobacilos de masa madre acumula aminoácidos en la masa de una manera dependiente de la cepa, mientras que las levaduras disminuyen los niveles de aminoácidos en la masa. Las

actividades metabólicas durante la proteólisis se describen en las Figuras 18 y 19 (Chavan y Chavan, 2011).

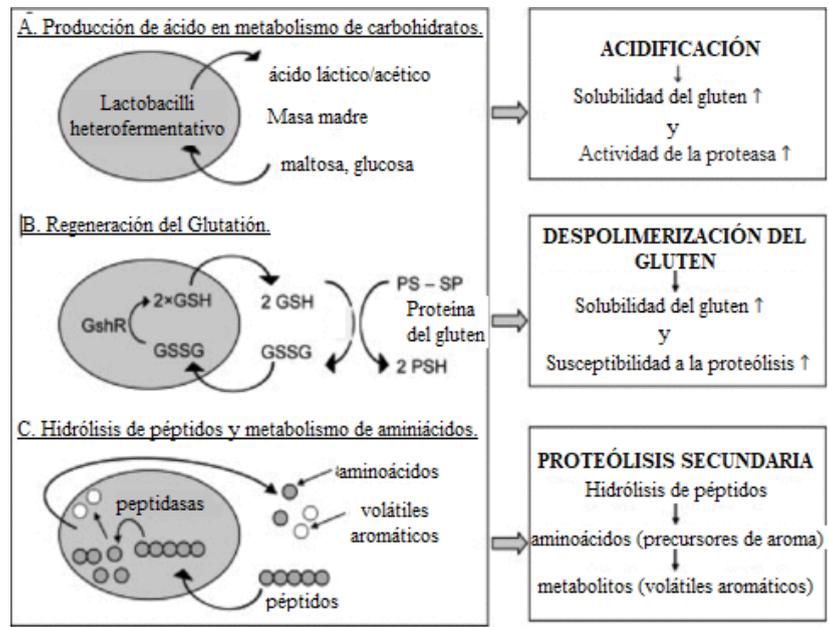


Figura 18. Contribución de las bacterias del ácido láctico a la proteólisis en masas madre (Chavan y Chavan, 2011).

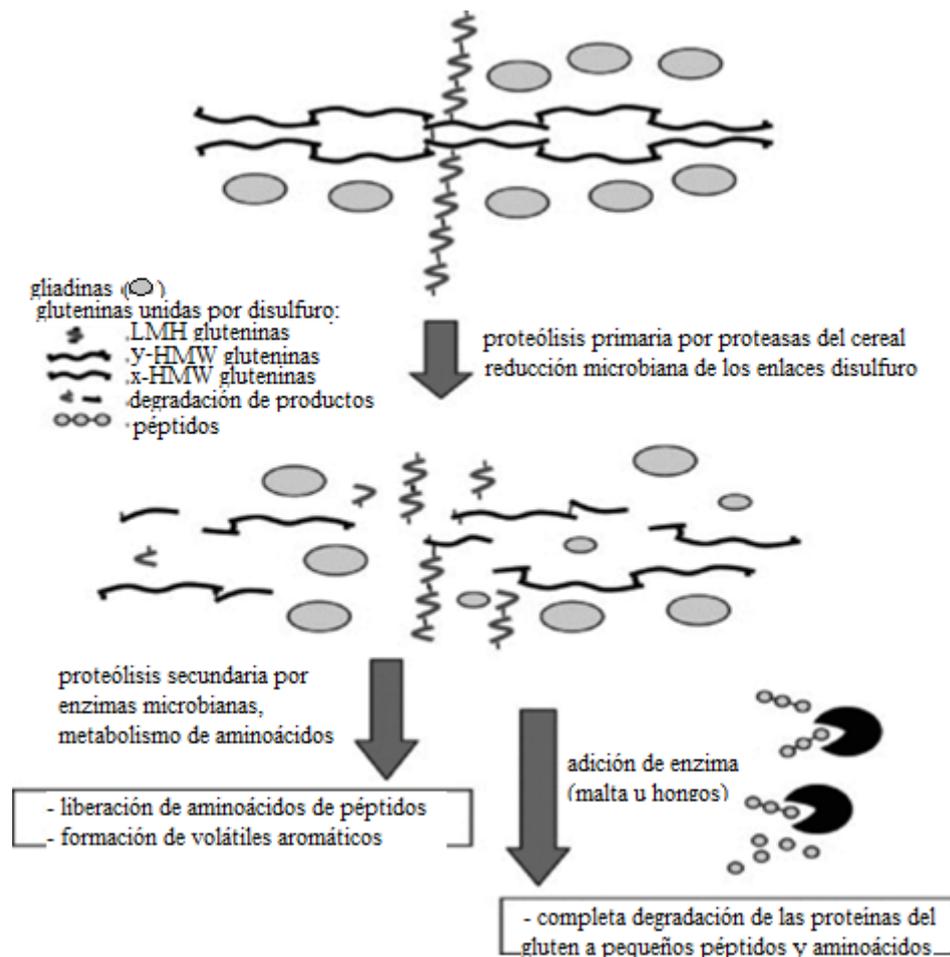


Figura 19. Eventos proteolíticos durante la fermentación de la masa madre: enzimas clave y actividades metabólicas para la proteólisis primaria y secundaria. La representación del macropolímero de gluten (Wieser, 2007).

#### **4.9. Producción de exopolisacáridos (EPS)**

Los EPS son polisacáridos microbianos secretados extracelularmente, la cantidad y sus estructuras dependen de los microorganismos particulares y del sustrato de carbono disponible (Korakli et al., 2001).

Los lactobacilos asociados a cereales producen una gran variedad estructural de EPS y oligosacáridos a partir de la sacarosa mediante la actividad de las glicosiltransferasas. Estos son producidos por LAB durante la fermentación, uno de los aspectos de la tecnología de masa madre con potencial para ser reemplazados por hidrocoloides. Estos compuestos, comúnmente denominados gomas, se utilizan como aditivos texturizantes, anti-incrustantes o prebióticos en la producción de pan (Tieking et al., 2003a, 2003b, 2003c).

Se pueden distinguir dos clases de EPS de LAB, homopolisacáridos (HoPS) y heteropolisacáridos (HePS), los homopolisacáridos contienen un tipo de monosacárido neutro, ya sea glucosa (glucanos), fructosa (fructanos) o galactosa (poligalactano), se han subclasificado según el tipo de enlace y la posición del carbono involucrado en el enlace. Por tanto, los glucanos se pueden subclasificar en:  $\alpha$ -glucanos y  $\beta$ -glucanos; los fructanos se pueden clasificar en: tipo levano y tipo inulina; por último, los poligalactanos, que contienen una unidad repetitiva pentamérica de galactosa. Los heteropolisacáridos son polímeros complejos compuestos por un esqueleto de subunidades repetidas, ramificadas o no ramificadas, que constan de tres a ocho monosacáridos, derivados de monosacáridos o monosacáridos sustituidos (Torino et. al., 2015).

La aplicación de HePS se limita actualmente a cultivos iniciadores lácteos "viscosos" empleados para mejorar la textura del yogur y otros productos lácteos fermentados. Además, el fructano producido por 2 cepas de *Lactobacillus* ha demostrado que *Lb. sanfranciscensis* estimula el crecimiento de bifidobacterias, actuando así como prebiótico o, en este caso, como factor bifidogénico. La aplicación de prebióticos aumenta tanto la aparición como el número de bifidobacterias fecales que se encuentran entre las bacterias más prominentes encontradas en el yeyuno con propiedades probióticas ampliamente aceptadas. Además, se informa que ciertas cepas de LAB poseen actividades que promueven la salud. Entre estas cepas de BAL probióticos se encuentran las que se han aislado de alimentos fermentados a base de cereales que son capaces de adherirse a las células intestinales humanas. De esto se desprende claramente que los sustratos bifidogénicos producidos por BAL (que generalmente se reconocen como seguros) y resistentes a pH bajo (no degradados durante la fermentación) y altas temperaturas (todavía disponibles después de hornear) pueden ser aceptables en alimentos como un posible componente prebiótico del mismo. Además, especies como *Lb. pontis*, *Lb. panis*, *Lb. mucosae*, *Lb. reuteri*, *Lb. oris*, *Lb. acidophilus*, y recientemente *Lb. rossiae*, se han encontrado tanto en intestinos y heces humanos como animales, así como en masas madre, y su posible actividad probiótica merece una mayor investigación (Roos et al., 2000; Simpson et al., 2000; Vuyst et al., 2001; Laws y Marshall, 2001; Dal Bello et al., 2001; Vogel et al., 2002; De Angelis et al., 2006).

#### **4. 10 Metabolitos volátiles en masa madre**

El gusto y el aroma, el olor, el sabor son sin duda los atributos más importantes que determinan la calidad del pan o de los cereales horneados en general. La fermentación de masa madre tiene un papel bien establecido, durante esta etapa se producen diferentes ácidos orgánicos que mejoran el sabor y la estructura de los panes de centeno y trigo (ayudan a la hinchazón del gluten y aumentan la retención de gases), lo que da como resultado productos con buena textura y volumen masivo (Park et al., 2006).

La harina integral es rica en fibra, minerales, vitaminas y muchos fitoquímicos como compuestos fenólicos, esteroides, tocoferoles y tocotrienoles, lignanos y ácido fólico. Con los procesos de masa madre, la sensación en boca y la palatabilidad del pan integral se pueden mejorar sin eliminar ningún componente nutricionalmente importante. El pan de masa madre tiene un mayor contenido de volátiles y, además, alcanza puntuaciones más altas en las pruebas sensoriales en comparación con, por ejemplo, el pan químicamente acidificado con ácido láctico y ácido acético. Se ha demostrado que algunos de los compuestos presentes en el pan son el metilpropanol (*iso* - butanol), 2- y 3 - metilbutanol (*iso* - pentanoles), acetato de etilo y lactato de etilo (Salmenkallio et al., 2001; Chavan y Chavan, 2011).

Hay dos categorías de compuestos de sabor que se producen durante la fermentación de la masa madre. Compuestos no volátiles, incluidos ácidos orgánicos, producidos por bacterias homofermentativas y heterofermentativas que acidifican, disminuyen el pH y aportan aroma a la masa de pan. La segunda categoría son los compuestos volátiles que incluyen alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y azufre. Todos estos compuestos son producidos por acciones biológicas y bioquímicas durante la fermentación. La generación de cantidades suficientes de compuestos volátiles durante la fermentación necesita un proceso de múltiples pasos de aproximadamente 12 a 24 horas, mientras que la fermentación con levadura de panadería se termina en unas pocas horas (Chavan y Chavan, 2011).

La generación de volátiles en masas madre está claramente influenciada por la actividad de las LAB y las levaduras de masa madre. Los factores que influyen en su actividad, como la temperatura y el contenido de agua, afectan en consecuencia las cantidades de metabolitos formados. Generalmente, las BAL son las principales responsables de la acidificación. La

reacción de degradación clave de los aminoácidos durante la fermentación de la masa es la vía de Ehrlich que conduce a los aldehídos o los alcoholes correspondientes, respectivamente. Al contrario, durante la cocción, la reacción de Strecker, iniciada por compuestos de  $\alpha$ -dicarbonilo como el metilglioxal (2-oxopropanal), también conduce a los aldehídos respectivos, pero también a los ácidos correspondientes. Debido a que las estructuras químicas de los aldehídos generados durante la vía de Ehrlich y la reacción de Strecker son idénticas, es un desafío diferenciar cuantitativamente entre las cantidades generadas a partir de las vías respectivas (Tabla 5 ). Durante la fermentación de la masa, también se observó un aumento significativo de los ácidos fenilpropanoicos, como el ácido ferúlico (Hofmann y Schieberle, 2000; Hansen et al., 2002).

Tabla 5. Compuestos volátiles identificados en masas madre de trigo imitadas e inoculadas (Chavan y Chavan, 2011).

	Alcoholes	Ésteres	Carbonilos y otros
Masa madre imitada	Propanol, pentanol	Acetato de etilo (tr)	Hexanal, benzaldehído ( E ) -2 - heptenal
Masa madre fermentada con cultivos iniciadores	Etanol, metilpropanol, butanol, pentanol, hexanol, 2 - hexanol, ( E ) -2 - hexenol, heptanol	Acetato de etilo, lactato de etilo, octanoato de etilo, acetato de hexilo	Hexanal, ( E ) -2 - heptenal, 2 - pentilfurano
Masa madre fermentada con cultivos iniciadores y levaduras de masa madre	Etanol, propanol, metilpropanol, 2 - butanol (tr), butanol, 2- y 3 - metilbutanol, pentanol, hexanol, 2 - hexanol, ( E ) -2 - hexenol, heptanol, octanol.	Acetato de etilo, propanoato de etilo, acetato de butilo, acetato de 2-metilbutilo, acetato de pentilo, hexanoato de etilo, acetato de hexilo, lactato de etilo, octanoato de etilo	3 - hidroxí - 2 - butanona (acetoína), 2,3 - butanodiona (diacetil), ( E ) -2 - heptenal, 2 - pentilfurano

\*La masa madre imitada se fabricó mediante la adición de ácido láctico y ácido acético al mismo nivel que en las masas madre y se mantuvo en las mismas condiciones.

## **4.11 Métodos de identificación de bacterias ácido lácticas (BAL)**

### **4.11.1 Métodos tradicionales**

Los métodos fenotípicos o tradicionales se basan en el estudio de las características morfológicas y microscópicas de las bacterias ácido lácticas así como las características bioquímicas, enzimáticas y fisiológicas, incluyendo resistencia a temperaturas de crecimiento, pH, sales a diferentes concentraciones, análisis de la pared celular y análisis total de proteínas citoplasmáticas solubles (SDS-PAGE), cromatografía de capa fina de ácidos orgánicos y análisis de ésteres metílicos de los ácidos (FAME) (Valdés, 2014).

#### **4.11.1.1. Estudios microscópicos**

Para estudiar a una bacteria microscópicamente, se emplea la tinción Gram para clasificar a los microorganismos en dos grandes grupos, las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Este método fue desarrollado por el científico danés Hans Christian Gram a finales de siglo XIX y hasta la fecha sigue siendo una de las tinciones más utilizadas universalmente debido a lo económico, eficaz y sencillo que resulta (Ríos y Villanueva, 2019).

Las BAL debido a su pared celular con mayor contenido de peptidoglucano son identificadas como bacterias Gram positivas. Las paredes de las células Gram positivas contienen una gruesa capa de peptidoglucano con numerosos enlaces cruzados de ácido teicoico (Figura 20) y las paredes de las células Gram negativas contienen una pared de peptidoglucano más delgada (Figura 21). Esto explica las diferencias en la tinción de Gram entre estos dos grupos de bacterias. Las bacterias Gram positivas son capaces de retener el primer colorante (cristal violeta), tiñéndose de violeta, en tanto que las Gram negativas no, lo que les permite reaccionar con el segundo colorante de contraste (safranina) adquiriendo un color rojo-rosado (Valdés, 2014; Ríos y Villanueva, 2019).

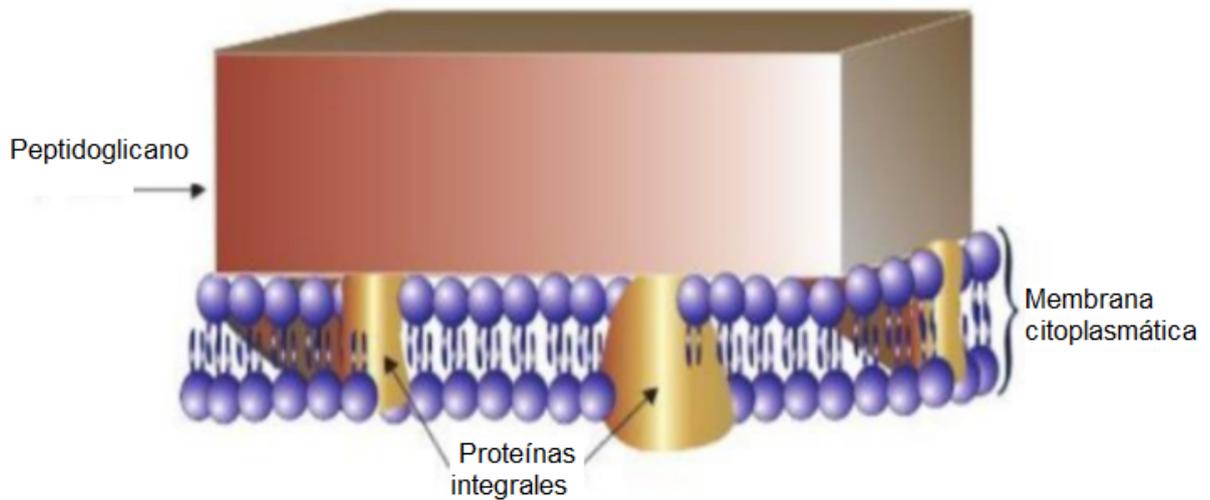


Figura 20. Modelo tridimensional de la “envoltura o cubierta” de una bacteria Gram positiva (Ríos y Villanueva, 2019).

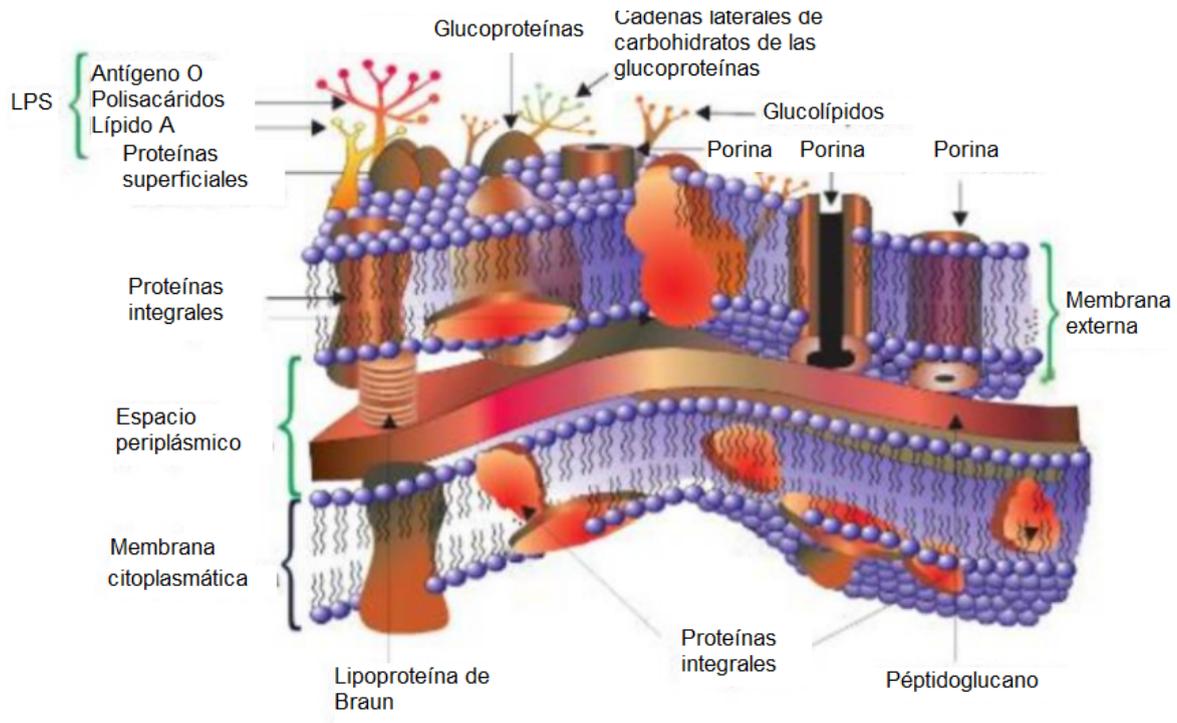


Figura 21. Modelo tridimensional de la cubierta o envoltura celular de la bacteria Gram negativa (Ríos y Villanueva, 2019).

#### **4.11.1.2. Estudios macroscópicos**

Para poder manejar a los microorganismos, por su tamaño, es necesario manejarlos como poblaciones, es decir, favorecer su multiplicación *in vitro*, en un medio de cultivo, ya sea en estado sólido, semisólido o líquido, que cuente con los nutrientes necesarios para permitir, en

condiciones favorables de pH y temperatura, su crecimiento (Valdés, 2014).

El caldo o agar MRS (Figura 22) se utiliza como medio de cultivo para *Lactobacillus*, se ha demostrado que estos medios promueven un buen crecimiento de todos los lactobacilos de origen oral, fecal, lácteo y de otras fuentes. Este medio contiene peptona y dextrosa, éstos suministran nitrógeno, carbono y otros elementos necesarios para su crecimiento. Contiene también polisorbato 80, acetato, magnesio y manganeso que proporcionan factores de crecimiento para cultivar una amplia variedad de lactobacilos. Los ingredientes anteriores pueden inhibir el crecimiento de algunos organismos distintos de los lactobacilos. Este medio se incuba a 30 y 42°C, dependiendo si se trata de lactobacilos mesófilos o termófilos, durante 48 h (Speranza et al., 2015; Ríos y Villanueva, 2019).

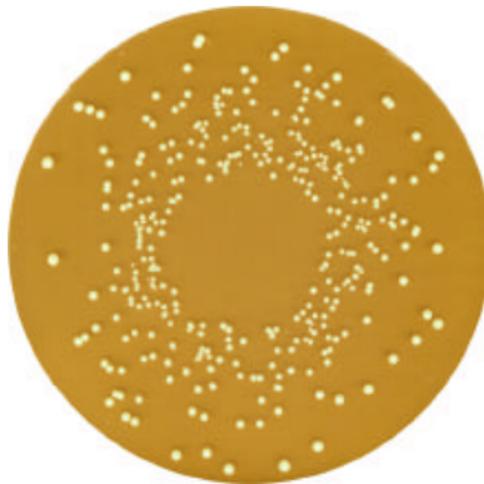


Figura 22. *Lactobacillus casei* ATCC 393. Agar MRS (Merck, 2010).

Otros medios generalmente utilizados para el aislamiento de BAL son:

- Agar APT.

Para la identificación de lactobacilos heterofermentativos y otros microorganismos exigentes. En condiciones de incubación a 37°C durante 48 h (Martínez et al., 2016; Ríos y Villanueva, 2019).

- Medio Elliker.

Para la identificación de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, lactobacilos homo y

heterofermentativos. En condiciones de incubación a 37°C durante 48 h (Martínez et al., 2016).

- Agar Rogosa (LBS)

Para la identificación de *Lactobacillus spp.* En condiciones de incubación anaeróbicas a 35°C de 24-48 h (Ramírez-López, 2016).

- Medio M5.

Para la identificación de bacterias ácido lácticas heterofermentativas u homofermentativas. En condiciones de incubación microaerófilas a 35°C. BAL homolácticas crecen en colonias azul-verde y producen el vire del indicador del medio de azul a amarillo, en cambio las BAL heterolácticas crecen en colonias blancas y no producen vire del indicador (Ramírez-López, 2016).

- Medio Litmus Milk.

Para la detección de actividad proteolítica de BAL. En condiciones de incubación a 35°C de 24-48 h (Ramírez-López, 2016).

La metodología empleada para aislar colonias de BAL consiste en, partir de 100 g o mL de alimento que contenga las bacterias ácido lácticas, se elaboran diluciones seriadas con solución salina para reducir la carga bacteriana. Posteriormente, se toman 100 µl de las últimas 3 diluciones elaboradas (el número de diluciones depende de la carga microbiana del alimento), y se vierten en placas de Petri con el medio sólido de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS), específico para bacterias ácido lácticas. Con una paleta trifásica estéril se distribuye la solución bacteriana por toda la placa Petri, para después ser incubadas a 37 °C en condiciones anaeróbicas por 24 h. Una vez que las colonias crecen, se comienza con el proceso de aislamiento, tomando con un asa las colonias que fueron diferentes una de otra y que presentaron morfología de BAL: formas circulares e irregulares, bordes ondulados y lisos, superficies planas y convexas, de colores traslúcidos, opacos y brillantes, blancos, cremosos, amarillentos, anaranjados y rojizos. Las colonias seleccionadas se resiembran en medio MRS sólido y se colocan en condiciones de anaerobiosis por 24 h hasta su crecimiento, el cual una vez logrado se resiembra y verifica hasta obtener cultivos axénicos o

puros (Cobo et al., 2019).

Un método para garantizar la viabilidad de las células de las bacterias ácido lácticas durante su almacenamiento, es mediante su inmovilización. *L. casei*, ha sido inmovilizado con alginato de sodio y *L. rhamnosus* ha sido microencapsulado en vehículos de alginatos recubiertos en sílice, durante su almacenamiento en frío. El microencapsular los probióticos los protege del oxígeno, así como sustratos y productos que se encuentren en el medio (García et al., 2020).

#### **4.11.2. Identificación bioquímica**

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de los microorganismos objeto de investigación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos a pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento de microorganismos con una incubación previa de 18-48h, a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar (Ríos y Villanueva, 2019).

Existen varias pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos las cuales se pueden dividir en 4 rubros:

- Pruebas que se utilizan en la identificación preliminar y con lectura inmediata como catalasa y oxidasa.
- Otras pruebas rápidas, con lectura en menos de 6 h, tal como la hidrólisis de hipurato,  $\beta$ -galactosidasa (ONPG), las aminopeptidasas, la ureasa y el indol.
- Pruebas lentas, con lectura de 18-48 h que incluirían óxido-fermentación, reducción de nitratos, rojo de metilo, Voges-Proskauer, agar hierro de Kligler, fermentación de azúcares, hidrólisis de esculina, coagulasa, fenilalanina-desaminasa, DNAsa, hidrólisis de gelatina, descarboxilasas, lipasa, lecitinasa, utilización de citratos, utilización de malonato, y prueba de CAMP, son las más frecuentes.
- Pruebas basadas en caracteres de resistencia a ciertas sustancias tal y como optoquinina, bacitracina, solubilidad en bilis y crecimiento en caldo hipersalino

(Moya, 2018).

#### **4.11.2.1 Pruebas primarias.**

##### **4.11.2.1.1 Prueba de catalasa.**

La prueba de catalasa es la clave para el esquema de identificación de muchos microorganismos Gram positivos, el método simple, se basa en tomar parte del crecimiento del microorganismo y extenderlo en discos de papel filtro para adicionarle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%; cuando la catalasa está presente, se observa aparición de gas en los discos de papel filtro. Esta reacción se basa en que la enzima catalasa cataliza la liberación de agua y oxígeno a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + catalasa= H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub>). El O<sub>2</sub> es un producto final oxidativo (producción rápida de burbujas) de la degradación aerobia de los azúcares; su presencia se determina por análisis directo de un cultivo bacteriano (Ríos y Villanueva, 2019).

##### **4.11.2.1.2 Prueba de oxidasa.**

La prueba de oxidasa detecta la presencia de la citocromooxidasa (citocromo c) presente en el transporte de electrones y en la vía metabólica del nitrato en ciertas bacterias, mediante el empleo de la oxidación del sustrato dihidroclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina a indofenol, un producto final de color púrpura. El desarrollo del color mencionado indica una prueba positiva, de lo contrario indica una prueba negativa y ausencia de la enzima. Por lo general, el sistema citocromo oxidasa solo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas facultativas y excepcionalmente, algunas microaerofílicas, aunque las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa (Ríos y Villanueva, 2019).

La incapacidad de las BAL para sintetizar porfirina da como resultado que estén desprovistas de catalasa y citocromos, es por ello que no poseen cadena de transporte de electrones y dependen de la fermentación para producir energía, mediante la fosforilación a nivel de sustrato (Richards, 2017; Saucedo, 2017).

##### **4.11.2.1.3 Prueba de oxidación-fermentación (O/F)**

Los microorganismos utilizan los azúcares por uno de dos procesos metabólicos, fermentativo y oxidativo. Algunos microorganismos pueden metabolizar un azúcar

(producción de ácido) solo en condiciones aerobias, mientras que otras producen ácido tanto de modo aerobio como anaerobio. La prueba O/F se hace cultivando el microorganismo en dos tubos con medio Hugh and Leifson (OFBM), en un tubo el medio está cubierto con una capa de aceite mineral y el otro expuesto al oxígeno atmosférico. Este proceso se detecta observando los cambios de color en los indicadores de pH a medida que se forman los productos ácidos. De esta manera, en la figura 23 se pueden observar los colores que tendría un tubo no inoculado, un tubo inoculado con un microorganismo que realiza fermentación y un tubo inoculado con un microorganismo que realiza oxidación (Ríos y Villanueva, 2019).

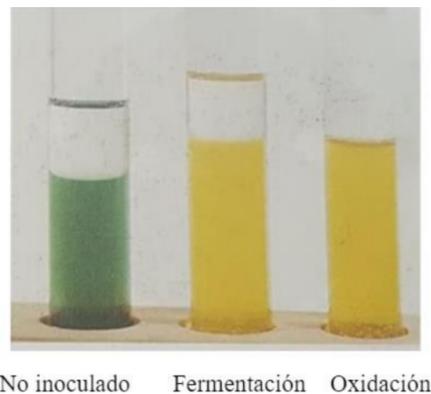


Figura 23. Representación de las pruebas de oxidación-fermentación (Ríos y Villanueva, 2019).

Como se mencionó anteriormente, todas las bacterias ácido lácticas crecen anaeróticamente. Sin embargo, y en contraposición a muchos anaerobios, la mayoría de las bacterias ácido lácticas no son sensibles al oxígeno y pueden crecer en su presencia, es por esto que se denominan anaerobios aerotolerantes. La mayoría de las bacterias ácido lácticas obtienen energía exclusivamente mediante el metabolismo de azúcares, por lo tanto, están normalmente restringidas a ambientes en los que hay azúcares disponibles (Madigan et al., 2009; Parra, 2010).

#### **4.11.2.2. Pruebas secundarias**

##### **4.11.2.2.1. Fermentación de carbohidratos.**

El principio de esta prueba es determinar la capacidad de un microorganismo para degradar un carbohidrato en específico incorporado en un medio basal y producir ácido, que se evidencia por el viraje del indicador que contenga el medio de cultivo utilizado (Ríos y

Villanueva, 2019).

#### **4.11.2.2.2. Métodos rápidos comerciales para la identificación de bacterias**

Los trabajos realizados sobre los métodos de múltiples pruebas de sustrato único a partir del cual evolucionó el sistema API, han conducido también al desarrollo de varios kits comerciales con tiras de plástico especiales para procedimientos de un solo paso para la identificación bacteriana. El uso de estos kits requiere inoculaciones con suspensiones de microorganismos de prueba en un medio basal, dado que la densidad requerida de microorganismos puede variar de acuerdo con el kit, las suspensiones deben prepararse como describe cada fabricante. Algunas de las pruebas necesitan una capa de aceite mineral estéril o parafina para asegurar una reacción microaerofílica adecuada y, después se necesita una incubación de 18-48 h. Para la identificación de *Lactobacillus* y otros géneros de BAL se usa la tira API 50 CHL. (Ríos y Villanueva, 2019)

#### **4.11.2.2.3. API 50 CHL.**

La galería del sistema API 50 CHL, está destinada a la identificación de *Lactobacillus* y microorganismos próximos (figura 24), se presenta listo para su empleo y permite realizar el estudio de fermentación de 49 azúcares diferentes. Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico y permiten la identificación del microorganismo con ayuda de un programa informático de identificación llamado ApiWeb diseñado por BioMérieux que compara los perfiles obtenidos con los de una base de datos para obtener el nombre del microorganismo correspondiente (Moya, 2018).

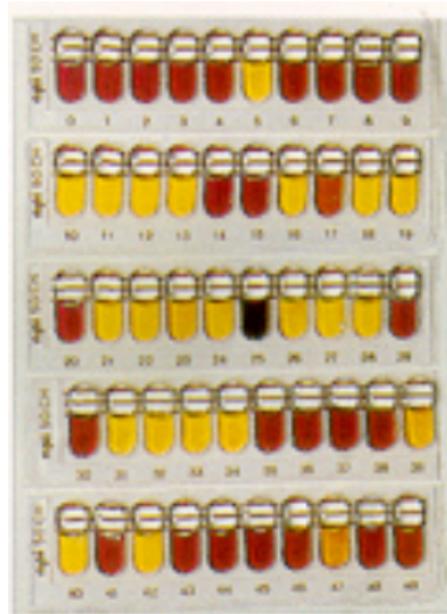


Figura 24. Tira API® 50 – CHL utilizado para la identificación de lactobacilos, galería conformada por 50 microtubos (BioMérieux, 2010).

### **4.11.3. Métodos moleculares**

Las técnicas genotípicas exhiben diferentes niveles de poder discriminatorio, se utilizan para la identificación y clasificación desde el nivel de especies a nivel de cepa. Muchos métodos genotípicos se basan en el principio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite la amplificación de fragmentos de ADN mediante el uso de primers específicos en condiciones controladas. Estos métodos se basan en la detección de polimorfismos de ADN entre especies y se diferencian por su capacidad discriminatoria del rango dinámico de taxonomía, reproducibilidad, facilidad de interpretación y normalización (Valdés, 2014).

Los primeros métodos de identificación molecular desarrollados fueron la hibridación ADN-ADN, análisis de secuencia del gen ARNr 16S, la hibridación con una sonda específica y el análisis RFLP o ribotipificación. A diferencia de las características fisiológicas y bioquímicas, la identificación molecular se basa en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos más que en los productos de su expresión (Ríos y Villanueva, 2019).

El progreso de las técnicas moleculares ha dado lugar a cambios en la taxonomía de las BAL, estableciendo nuevas relaciones filogenéticas. Los métodos moleculares más conocidos para la identificación de las BAL dependientes del cultivo son: perfil de plásmidos, electroforesis

en gel de campo pulsado (PFGE), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD), amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP), análisis de restricción de amplificación ribosomal (ARDRA), entre otros (Valdés, 2014).

#### **4.11.3.1 Dependientes del cultivo**

##### **4.11.3.1.1 Porcentaje G-C**

La determinación del porcentaje de G-C fue la primera técnica empleada para la clasificación taxonómica basada en el análisis del ADN, determinando el porcentaje de G-C con respecto a las bases totales. Generalmente en BAL es menor al 50% aunque algunas especies de *Lactobacillus* tienen contenidos mayores al 55% (Ortiz, 2018).

El contenido de GC (guanina-citosina) en mol% del DNA es la proporción de guaninas y citosinas respecto al total de nucleótidos del genoma. Para el caso de las bacterias ácido lácticas, poseen un bajo contenido de GC, algunos de los porcentajes para los géneros representativos de BAL son: *Streptococcus* (34-36 mol%), *Leuconostoc* (38-41 mol%), *Pediococcus* (34-42 mol%), *Lactobacillus* (32-53 mol%), *Enterococcus* (38-40 mol%) y *Lactococcus* (38-41 mol%) (Madigan et al., 2009).

##### **4.11.3.1.2 Electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE)**

La PFGE permite la separación de fragmentos de ADN obtenidos a partir de la digestión con enzimas de restricción. En la PFGE es crucial la extracción de ADN cromosómico intacto. Los fragmentos son separados como un patrón de distintas bandas, usando una cámara que aplica campo eléctrico que cambia de posiciones en el gel de agarosa en tres juegos de electrodos que forman un hexágono alrededor del gel. Las bandas representan el genoma completo y por lo tanto puede detectar cambios específicos (inserciones, deleciones y reordenamientos) dentro de una cepa particular. Las bandas de ADN obtenidas dependen de la especificidad de la enzima de restricción y de la secuencia del genoma bacteriano. Esta técnica es útil para la diferenciación a nivel de cepa que pertenece a la misma especie. La técnica de PFGE, es empleada para la identificación de una gran variedad de bacterias ácido lácticas (Valdés, 2014).

#### **4.11.3.1.3. Amplificación de ADN polimórfico al azar (RAPD)**

Es un método rápido, sensible y de bajo costo para la tipificación genética de las diferentes cepas de BAL. Esta técnica emplea un cebador corto (aproximadamente 10 nucleótidos, con 55-80% de GC) para amplificar fragmentos de ADN al azar y separarlos mediante una electroforesis en gel de agarosa, donde se visualizan bandas de diferentes pesos moleculares. El patrón de bandas se analiza mediante una matriz de ausencia y presencia de bandas que permite la identificación entre especies y subespecies. Para que esta técnica sea reproducible se debe estandarizar y optimizar las condiciones de reacción, la calidad y cantidad de enzima polimerasa y ADN extraído, concentración de cebadores, concentración de magnesio y la precisión de pipetas ya puede causar variaciones en el método (Valdés, 2014).

#### **4.11.3.1.4. Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA)**

Este método está basado en la obtención de ADN ribosomal mediante la amplificación por PCR de productos de ADN de microorganismos aislados usando cebadores universales. El producto se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos se analizan en geles de agarosa, después se estudia el patrón de bandas. Es muy eficiente para la identificación de las especies de *Lactobacillus* (Valdés, 2014).

#### **4.11.3.1.5. Amplificación de fragmentos largos polimórficos (AFLP)**

Esta técnica consiste en tres etapas: 1) El ADN genómico se digiere con dos enzimas de restricción y la ligación de adaptadores específicos al sitio de restricción de todos los fragmentos; 2) Amplificación preselectiva y selectiva de los fragmentos con dos cebadores complementarios al adaptador y al sitio de restricción; 3) Separación de los productos de PCR por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). La introducción de alineaciones erróneas deliberadas en los extremos 3' del cebador influye en el número de fragmentos amplificados y el poder discriminatorio de los patrones (Valdés, 2014).

#### **4.11.3.1.6. Identificación de bacterias por secuenciación del gen ribosomal 16S**

Los ribosomas son moléculas presentes en todos los organismos vivos que se utilizan para el

proceso de síntesis de proteínas, el material que contiene se utiliza como cronómetro molecular debido a que la estructura primaria de sus dos subunidades ARNr 16S y 23S poseen una combinación particular de regiones conservadas, variables e hipervariables. El gen ARNr 16S es el más ampliamente utilizado para la identificación de especies bacterianas, es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 pares de bases, su uso como marcador taxonómico es adecuado para relacionar filogenéticamente a los microorganismos, debido a que dichas secuencias han sido compiladas en grandes bases de datos como GenBank alojado en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). La comparación de secuencias del gen ARNr 16S ha facilitado la identificación de bacterias, incluyendo microorganismos no cultivables, es por ello, que es una de las técnicas más utilizadas en los últimos años para la identificación de microorganismos en alimentos fermentados (Valdés, 2014; Castañeda, 2017; Moya, 2018).

Para llevar a cabo la identificación de la bacteria, se tiene que llevar a cabo primero la reacción de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) con la cual se amplifican los fragmentos de ADN en estudio en tres etapas: 1) Desnaturalización del ADN, 2) Alineamiento y 3) extensión del ADN. Posteriormente, se lleva a cabo la secuenciación que puede ser enzimática, química o automática, para realizar un análisis taxonómico de secuencias, en donde la secuencia obtenida se compara con bases de datos de secuencias ribosomales de acceso público o privado, con el objetivo de identificar la cepa de la que proviene (Castañeda, 2017).

Los genes del ARNr 16S contienen generalmente nueve “regiones hipervariables” (V1-V9) que muestran secuencias de diversidad considerable entre las diferentes especies de bacterias. Estudios han demostrado que al amplificar estas regiones por PCR utilizando cebadores específicos y universales para cada región, identifican una sola especie bacteriana. La región variable (V1-V3) del ARNr 16S se ha convertido en una opción viable para la identificación de las BAL. Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre secuencias de los ARNr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva (Valdés, 2014).

### **4.11.3.2 Independientes del cultivo**

#### **4.11.3.2.1. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)**

Se trata de un método independiente del cultivo que se basa en la separación de fragmentos de ADN de doble cadena del mismo tamaño con secuencias diferentes. La separación de bandas depende de la secuencia de nucleótidos y contenido de %G+C, diferentes secuencias tendrán como resultado diferentes orígenes de dominios de fusión y como consecuencia diferentes posiciones en el gel. Se preparan fragmentos de hasta 500 pares de bases amplificados por PCR para ser separados en un gel de gradiente desnaturalizante por urea y formamida a una temperatura constante de 55-60°C (Valdés, 2014).

### **4.11.4 Métodos nuevos**

#### **4.11.4.1 Secuenciación de Genomas Completos**

Esta prueba evalúa todas las bases del genoma, al secuenciar todas las regiones codificantes y no codificantes del genoma (Figura 25). Tiene como ventaja que es la mejor prueba para la detección de nuevas variantes genéticas y estructurales que no se asociaban previamente. Es la prueba con menos sesgos durante el análisis de genes, debido a que la secuenciación no está dirigida hacia genes específicos. En la actualidad, su uso sigue siendo poco frecuente, debido a su mayor costo, mayor tiempo de entrega de informe, falta de anotaciones sobre regiones no codificantes y la dificultad en el análisis e interpretación de sus resultados (Morozova y Marra, 2008; Rodríguez y Armengol, 2012; Rubio et. al., 2020).

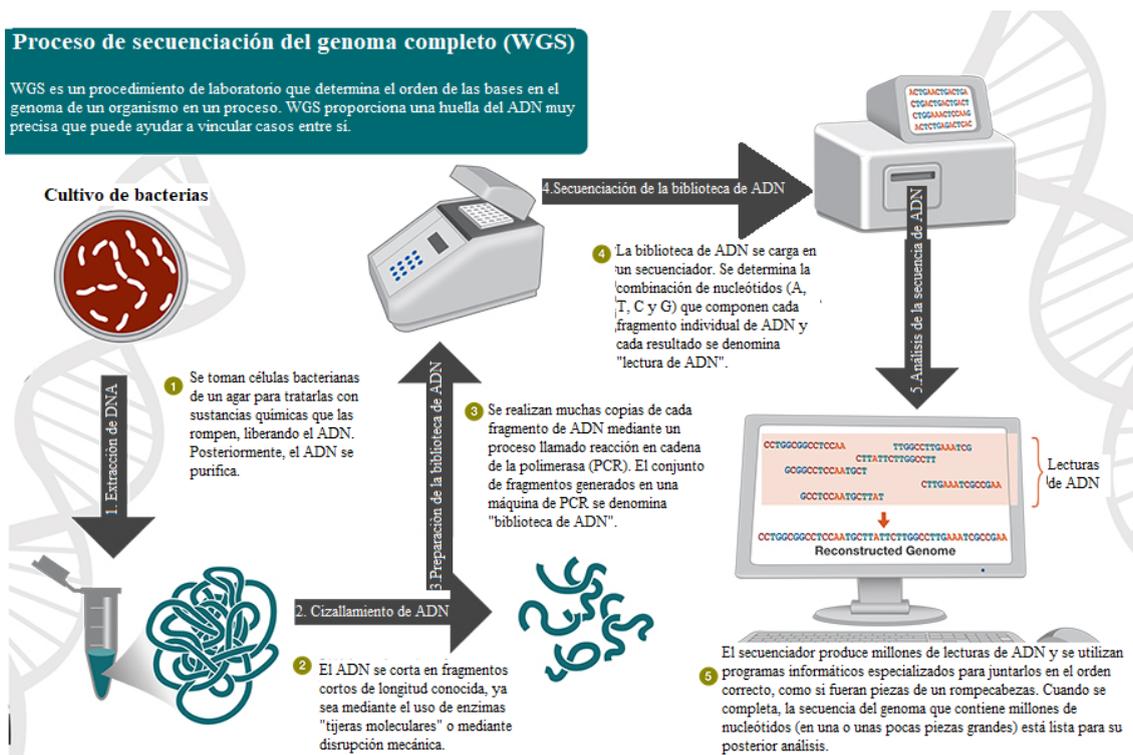


Figura 25. Proceso de secuenciación del genoma completo (WGS) (NCEZID, 2013).

#### 4.11.4.2 Ciencias Ómicas

Las ciencias ómicas abarcan el estudio de diferentes moléculas involucradas en el desarrollo y mantenimiento de la vida en todos los niveles de organización, desde el orgánulo hasta el ecosistema, incluido el nivel del organismo (Figura 26). Por lo general, se dirigen principalmente a la detección de genes (genómica), ARNm (transcriptómica), proteínas (proteómica), lípidos (lipidómica) y metabolitos (metabolómica) en una muestra biológica específica de forma no dirigida y no sesgada. El objetivo final de estos estudios es entender la célula como un sistema integrado que interactúa con el entorno, más que como una colección de partes independientes (Lay et al., 2006; Horgan y Kenny 2011; Sánchez et al., 2013).

Relacionado con el estudio de la fermentación de alimentos, la metagenómica podría superar las limitaciones debido a la presencia de organismos cultivables y no cultivables, sin embargo, no se puede obtener toda la información del estudio de genes per se porque las proteínas son las responsables de los fenotipos y actividad de las células; además, la proteómica podría permitir comprender el proceso de fermentación mediante el estudio de la expresión de proteínas en función de las variables ambientales cambiantes. Finalmente, los estudios metabolómicos podrían usarse para correlacionar cualidades nutricionales y

sensoriales, para seleccionar compuestos marcadores de sabor, biomarcadores para monitorear la fermentación, etc. (Rizo et al. 2018).



Figura 26. Principales ventajas de las ciencias ómicas en el estudio de los alimentos fermentados (Rizo et. al., 2018).

## **4.12 Métodos de identificación de metabolitos volátiles**

### **4.12.1 Determinación de carbohidratos, ácidos orgánicos y alcoholes**

La metodología consiste en homogeneizar diez gramos de masa madre madura con 90 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,8 y tratar durante 3 min en un mezclador Bag Mixer 400P (Interscience, St Nom, Francia). Después de la incubación (a 25 ° C durante 30 min con agitación), se obtiene el extracto soluble en agua por centrifugación (12 857 x g, 10 min, 4 ° C). Se determinan maltosa, glucosa, fructosa, ácido láctico, ácido acético y etanol en el extracto soluble en agua de masas madre mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un sistema ÄKTA Purifier™ (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia) equipado con una columna de intercambio catiónico de 300 mm × 7,8 mm de diámetro interior (Aminex HPX-87H, Bio-Rad Laboratories, CA) y un detector de índice de

refracción ( Perkin Elmer Corp., Waltham, MA) (Zeppa et al., 2001).

#### **4.12.1.1 Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC)**

La cromatografía líquida (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La fase estacionaria es sílica que se ha tratado. La fase móvil actúa de portador de la muestra (Figura 27).

La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra.

Un detector, colocado a la salida de la columna, proporciona un registro continuo de la composición del líquido que sale, por lo que permite obtener un cromatograma que se utiliza para identificar y cuantificar los componentes de la muestra. La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar (Gómez y Martín, 2010; Volonté y Quiroga, 2013).

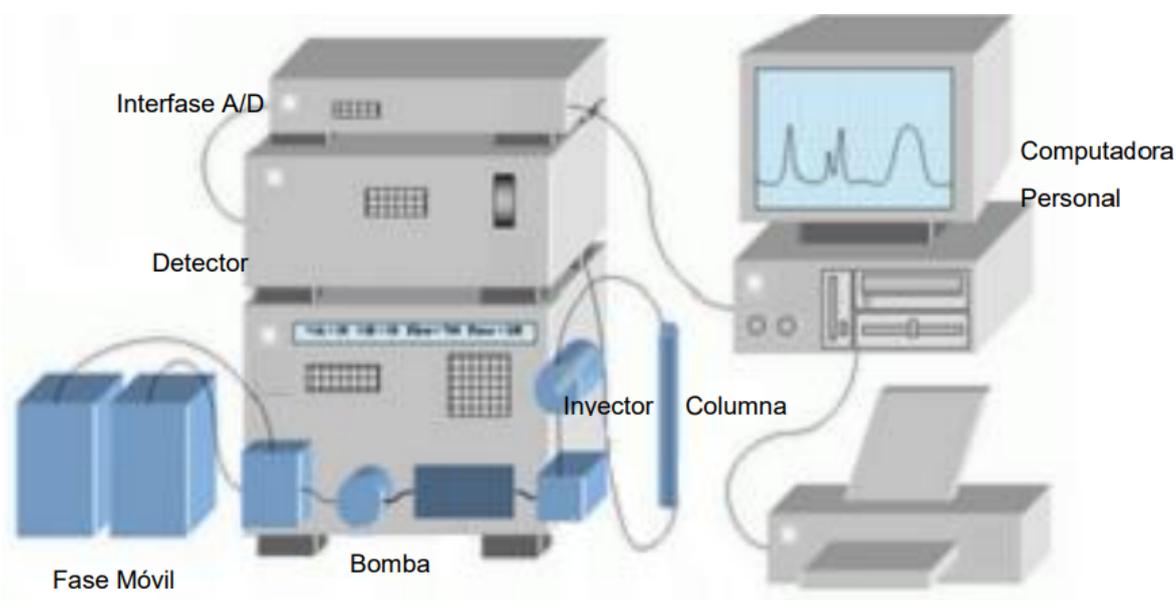


Figura 27. Esquema de un HPLC (Volonté y Quiroga, 2013).

#### **4.13 Métodos de identificación de exopolisacáridos**

El análisis estructural y los rendimientos de cualquier EPS comienzan con el aislamiento de polímeros puros. En este sentido, uno de los aspectos más importantes es evitar la

contaminación del EPS con componentes del medio de cultivo microbiano, generalmente extracto de levadura que contiene manano. Se han reportado diferentes protocolos de aislamiento de EPS, entre los que se incluyen:

- Eliminación de células por centrifugación o filtración.
- Precipitación del polímero del sobrenadante libre de células mediante la adición de etanol o acetona refrigerados (las cantidades necesarias para lograr la recuperación del EPS dependen del tipo de polímero liberado; se suelen utilizar dos o tres volúmenes).
- Diálisis y secado del polímero precipitado, y recientemente, una nueva etapa de re-precipitación y diálisis (Ruas-Madiedo y de los Reyes -Gavilán, 2005).

La purificación de EPS también puede incluir filtración por membrana, intercambio aniónico y cromatografía de permeación en gel. En general, en el aislamiento de EPS de medios de cultivo con alto contenido de proteínas, estas se eliminan típicamente mediante precipitación con ácido tricloroacético, hidrólisis con proteasas o una combinación de ambos (Sanz y Martínez-Castro, 2007).

#### **4.13.1 Filtración por membrana**

La filtración por membrana es un método de separación física que permite separar moléculas de diferentes tamaños y características. La fuerza impulsora es la diferencia de presión entre los dos lados de una membrana especial. La tecnología de membranas reduce los costos de producción generales a la vez que mejora la calidad del producto. La filtración por membrana se puede utilizar con productos alimenticios de diferente grado de viscosidad (AlfaLaval, 2015).

La concentración de exopolisacáridos se estima como el contenido de carbohidratos neutros generalmente determinado por el método de fenol-ácido sulfúrico o bien, mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento junto con detección de índice de refracción (RI) (HPSEC-RI); donde se calcula mediante la integración de la señal de RI utilizando curvas de calibración obtenidas con dextranos de peso molecular (MW) conocidos (Vaningelgem et al., 2004; Sánchez et al., 2006).

#### **4.13.2 Cromatografía de permeación en gel (GPC)**

También denominada cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), es un tipo de cromatografía líquida en la cual la fase estacionaria es sólida y la fase móvil es líquida, permite estudiar los pesos moleculares de los polímeros y su distribución. Los pesos moleculares relativos, pueden calcularse a partir de los datos de concentración de polímero como función del tiempo. Para obtener el peso molecular exacto, debe trazarse una curva de calibración.

En un mayor grado de especificidad o complejidad, el fraccionamiento de flujo de campo (FFF) y la cromatografía hidrodinámica (HDC) se pueden utilizar para determinar el peso molecular (MW) promedio de polisacáridos de masa molar (MM) ultra altos (Cave et al., 2009 ; Isenberg et al., 2010; Galle et al., 2012).

#### **4.13.3 Cromatografía Hidrodinámica (HDC)**

En la cromatografía hidrodinámica, las columnas se empaquetan con macropartículas no porosas, construyendo canales de flujo, y la separación se produce por el gradiente de velocidad dentro de los capilares entre las partículas del empaquetamiento. Así, las partículas más grandes se transportan más rápido que las más pequeñas, ya que pasan menos tiempo cerca de los bordes de los capilares (Baches, 2019).

La composición de monómeros de EPS se puede determinar mediante hidrólisis ácida total seguida de detección de monómeros usando cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (HPAEC) con detección amperométrica pulsada (PAD). Alternativamente, la metanólisis y la pertrimetilsililación proporcionan muestras que pueden analizarse mediante cromatografía de gases (GC) (Cataldi et al., 2000).

#### **4.13.4 Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)**

Entre los métodos analíticos para aplicaciones de análisis de alimentos de rutina, HPAEC-PAD presenta una detección altamente específica y sensible de monosacáridos, así como la más alta resolución de separación de oligosacáridos. Además, se puede realizar mayoritariamente de forma automatizada. HPAEC-PAD se ejecuta en condiciones altamente

alcalinas, transformando parcial o completamente grupos hidroxilo en oxianiones. Estos oxianiones son retenidos diferencialmente por una columna de intercambio aniónico y pueden eluirse sucesivamente usando un gradiente creciente de un ión de empuje, normalmente acetato o nitrato. La tasa de retención de los analitos está influenciada por una amplia gama de parámetros que afectan su interacción con la fase estacionaria, incluyendo isomería posicional, anomería, el número de grupos hidroxilo, el tamaño molecular (Mechelke et al., 2017).

La detección dentro de un sistema HPAEC-PAD se basa en la oxidación selectiva de los grupos hidroxilo de los analitos. La oxidación tiene lugar en la superficie de un electrodo hecho de un metal noble, generalmente oro, al que se le aplica repetidamente una determinada forma de onda con diferentes potenciales (Mechelke et al., 2017).

#### **4.13.5 Espectroscopía de RMN de alta resolución.**

Se puede obtener información adicional sobre las características estructurales del EPS a través de la espectroscopia de RMN de alta resolución, es el método más poderoso para la identificación inequívoca de cadenas de carbohidratos. Este método proporciona información sobre el tipo de monosacáridos constituyentes, el tamaño del anillo, la configuración anomérica y la posición de los enlaces glicosídicos (Damager et al., 2010).

#### **4.14 Aplicaciones beneficiosas de la tecnología de masa madre**

Existe un creciente interés de los consumidores por los aspectos sanitarios de los alimentos, incluidos los productos alimenticios funcionales con funciones fisiológicas específicas de relevancia para la salud. Sin embargo, las buenas propiedades sensoriales siguen siendo un requisito previo para cualquier alimento exitoso, y los consumidores también esperan que los alimentos cumplan con otros criterios como la seguridad y la conveniencia (Chavan y Chavan, 2011).

##### **4.14.1 Fibra dietética (DF) en masa madre**

Nutricionalmente, los alimentos a base de cereales son una fuente importante de carbohidratos, proteínas, DF y muchas vitaminas. Durante mucho tiempo, la DF se ha

considerado el principal componente protector de la salud de los cereales. Ahora hay cada vez más pruebas de otros compuestos protectores, como oligosacáridos y fitoquímicos, que junto con la DF se concentran en las capas externas de los granos. Los niveles y también la biodisponibilidad de carbohidratos y varios compuestos bioactivos pueden verse notablemente influenciados por el procesamiento. Otro ejemplo del potencial de la masa madre es la capacidad de modificar la fracción de salvado del grano (rico en fibra) de tal manera que se puedan utilizar mayores cantidades de salvado en los panes. La importancia nutricional de la FD se ha demostrado en muchos estudios. Una dieta occidental típica contiene menos de 20 gramos / día, mientras que la ingesta diaria recomendada es de 25 a 30 g. Actualmente, la mayoría de la gente come muy poca fibra y estos niveles bajos de DF en la dieta occidental contribuyen a una larga lista de enfermedades, que van desde la caries dental hasta el estreñimiento, la obesidad, el cáncer colorrectal, la enfermedad coronaria y la diabetes tipo 2. La fuente más común de DF en la repostería es el salvado de cereales, especialmente el salvado de trigo. El uso de salvado de cebada derivado de cebada sin cáscara o descascarada o salvado de avena derivado de granos de avena descascarados también se está generalizando debido a su alto contenido de FD soluble, en particular su contenido de  $\beta$ -glucano mezclado.(Chavan y Chavan, 2011).

#### $\beta$ -glucanos

Los  $\beta$ -glucanos son homopolisacáridos lineales de glucosa unidos a través de enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) y que pueden presentar ramificaciones. No son digeribles en el intestino delgado del ser humano debido a que no existen enzimas pancreáticas o intestinales capaces de degradarlas, por lo cual son clasificados como fibra dietética soluble. La estructura macromolecular y en particular el tipo de enlaces de la cadena principal y de sus ramificaciones dependen de la fuente del  $\beta$ -glucano y permite diferenciarlos entre sí. Por ejemplo, los  $\beta$ -glucanos de avena y cebada (figura 28) están compuestos de cadenas no ramificadas con enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) y  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (Lazaridou y Biliaderis, 2007. Wood, 2007. Pizarro et al., 2014).

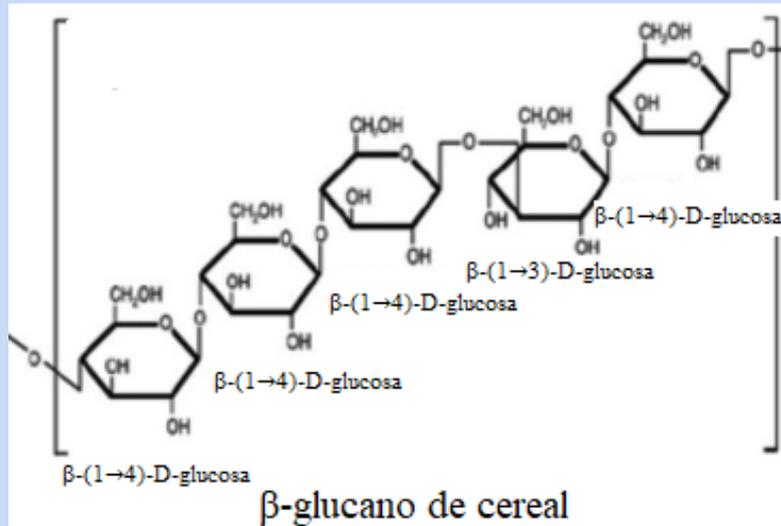


Figura 28. Unidades poliméricas de  $\beta$ -(1-4)-D-glucopiranosil  $\beta$ -(1-3)-D-glucopiranosil (Volman et al., 2008).

La incorporación de fibra dietética en los sistemas alimentarios puede afectar las propiedades funcionales de otros componentes dentro del sistema. La textura, la calidad del color y la sensación en boca de los productos terminados se verán afectados. Los cambios tecnológicos debidos a la adición de fibra incluyen aumentos en el rendimiento de la masa; una masa más húmeda y corta; disminución de la tolerancia a la fermentación (es decir, la masa mantiene el volumen óptimo por menos tiempo durante la prueba) y una miga tensa y no elástica (Brennan y Samyue, 2004).

La adición de fibra puede tener un efecto adverso sobre el volumen, el color y la textura de los productos de panadería y, a su vez, afectar la aceptación de los consumidores. Los panes ricos en fibra provenientes de diferentes fuentes, presentan volúmenes de barra más pequeños que los panes sin enriquecimiento de la misma. Este efecto posiblemente se deba a la dilución del gluten (dado que las partículas de fibra también pueden interactuar con él) que es responsable de la formación de estructuras en el pan y con ello presentar una reducción de la retención de gas. La masa con alto contenido de fibra también tiene un mayor requerimiento de oxidación (para permitir el desarrollo del gluten) (Wang et al., 2002; Anil, 2007; Hu et al, 2009).

El color de la miga y la corteza del pan puede afectar las preferencias del consumidor. El dorado de la corteza se debe a reacciones de Maillard y caramelización. Por lo tanto, el color del pan depende de las características fisicoquímicas, incluido el contenido de agua, el pH, el contenido de azúcares reductores y el contenido de aminoácidos en la masa. Los panes enriquecidos con fibra tienen una corteza más clara debido al menor contenido de harina, por otro lado, el efecto del color de la miga depende mucho del color de la fibra agregada. Por ejemplo, el pan con salvado de trigo tiene un mayor grado de marrón (Anil, 2007; Sabanis et al, 2009).

#### **4. 14. 2 EPS de *Lactobacilli***

La adición de polisacáridos vegetales es una práctica común en la producción de pan o masa congelada para mejorar las propiedades de textura y la vida útil del pan. El dextrano proveniente de *Leuc. mesenteroides* encuentra aplicación comercial en mejoradores de horneado. Otros autores informaron que la adición de dextrano a un nivel de 5 g / kg de harina afectó las propiedades viscoelásticas de las masas de trigo y los volúmenes de los panes correspondientes en mayor medida que la adición de los mismos niveles de reuterano o levano, polímeros producidos a partir de *Lactobacilli*, por lo tanto, se puede esperar que afecte de manera beneficiosa una o más de las siguientes propiedades tecnológicas de la masa y el pan:

- Absorción de agua de la masa.
- Reología y maquinabilidad de la masa.
- Estabilidad de la masa durante el almacenamiento congelado.
- Volumen del pan
- Endurecimiento del pan.

Mejorando así, la calidad nutricional y sensorial del producto (Tieking et al., 2003a, 2003b; Decock y Cappelle, 2005).

Los EPS producidos por *Lb. sanfranciscensis* mejoran las propiedades nutricionales de los

productos fermentados de masa madre debido al hecho de que pueden ser metabolizados por bifidobacterias. Algunas LAB de masa madre han mostrado actividades hidrolizantes hacia los péptidos de prolamina implicados en la intolerancia a los cereales en humanos (Korakli et al., 2001; Di Cagno et al., 2002; López et al., 2003; Magnusson et al., 2003).

#### **4. 14. 3 Desarrollo de sabor**

El sabor de los productos horneados con levadura está influenciado por las materias primas, la fermentación de la masa madre, el tipo de entrantes y las condiciones de fermentación y horneado. La relación entre ácido láctico y ácido acético es un factor importante que afecta el aroma del producto final, y está influenciado por el microorganismo fermentador, la temperatura de fermentación y el tipo de harina (Hansen y Schieberle 2005; Corsetti y Settanni 2007).

El uso óptimo de la masa madre puede mejorar el sabor, el pan de trigo de masa madre es más rico y aromático que el pan de trigo común, un factor que se puede atribuir al largo tiempo de fermentación de la masa madre. La concentración de 2-feniletanol, uno de los olores más potentes de la miga de pan de trigo y su contenido aumenta en la miga de pan de masa madre (Rehman et al., 2006).

En general, el proceso de horneado influye en el aroma típico de la corteza del pan, mientras que la fermentación de la masa es fundamental para el desarrollo del sabor de la miga. El compuesto 2-acetilpirrolina, se ha atribuido como el aroma más característico de la corteza del pan de trigo de masa madre (Corsetti y Settanni, 2007; Yazar y Tavman, 2012).

Las cepas de *Lactobacillus sanfranciscensis* muestran un perfil amplio y homogéneo de volátiles, que difieren mucho de los de las otras especies heterolácticas. Puede definirse como único entre los LAB de masa madre e insustituible en la producción de masa madre. Acetato de etilo, alcoholes (etanol, 1-propanol, 2-metil-1-pentanol, 1-heptanol y 1-octanol), aldehídos (3-metil-1-butanal, heptanal, trans-2-heptanal, octanal y nonanal) y el ácido acético son los

principales compuestos producidos por *L. sanfranciscensis* (Yazar y Tavman, 2012).

Recientemente, se demostró que la fermentación induce la producción de compuestos aromatizantes también en productos sin gluten. Por ejemplo, la fermentación del sorgo para la producción de towga (una papilla fermentada con ácido láctico tradicional de Tanzania) generó diferentes compuestos aromatizantes. Los alcoholes se produjeron en alta concentración cuando la fermentación se realizó con microorganismos como *Lb. orientalis* en combinación con *L. brevis* o *Lb. plantarum*, y *Lb. plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*. La producción de aldehídos se incrementó mediante la cofermentación con *Lb. plantarum* y levaduras. Por otro lado, la fermentación con cultivos mixtos que contienen *Lb. plantarum* mejoró el contenido de diacetilo en las harinas fermentadas de maíz (Mugula et al., 2003; Edema y Sanni, 2008).

Además de la formación de polímeros en la masa, los *lactobacilos* formadores de EPS para su uso en aplicaciones de horneado también deben exhibir rasgos metabólicos adicionales para lograr un mejor sabor, textura y vida útil del pan. Por ejemplo, las cepas formadoras de EPS de las especies *L. pontis* y *Lb. reuteri* también exhiben el metabolismo de la arginina con efectos positivos sobre el sabor del pan. Además, las cepas formadoras de EPS de *Lb. reuteri* que producen reuteriicina en la masa, retrasando el crecimiento de bacilos formadores de filamentos que se encuentran en el pan (Gänzle y Vogel 2002; Thiele et al., 2002; Tieking et al., 2003c).

#### **4.14.4. Influencia de la masa madre en la digestibilidad del almidón**

Un aumento en la cantidad de carbohidratos de rápida digestión en la dieta, aumenta los niveles de glucosa en sangre, particularmente en el período posprandial. Las principales fuentes de carbohidratos en la dieta occidental contienen almidón de rápida digestión, en consecuencia, se producen respuestas glucémicas altas. Existen fuertes indicios de que las grandes cantidades de glucosa rápidamente disponible, derivada del almidón y los azúcares libres en la dieta moderna (alimentos con alto índice glucémico (IG) y alto índice de insulina), conducen a niveles elevados periódicos de glucosa e insulina en plasma,

concentraciones que resultan perjudiciales para la salud (Barclay et al., 2008).

La macro y microestructura de los alimentos a base de cereales tiene una profunda influencia en la digestibilidad del almidón, aquellos almidones ricos en amilosa son más resistentes a la amilolisis que los almidones cerosos o normales, sin embargo, como resultado de la gelatinización durante el procesamiento, la tasa de amilolisis aumenta drásticamente. Por lo tanto, cuanto más gelatinizado esté el almidón, más rápidamente se digiere. En alimentos como en el pan blanco de trigo, el almidón está muy gelatinizado y la estructura del producto es muy porosa, lo que produce una rápida degradación del almidón en el intestino delgado y un aumento muy rápido del nivel de glucosa en sangre (IG alto) (Lauro et al., 2000; Östman, 2003).

Se ha demostrado que el uso de masa madre reduce el IG del pan de cebada integral y del pan de trigo, así como el índice de insulina (II) de panes de centeno con contenido variable de fibra. Este efecto se debe principalmente a la formación de ácidos orgánicos, especialmente ácido láctico, durante la fermentación, el cual reduce la tasa de digestión del almidón en el pan; por otro lado, los ácidos acético y propiónico parecen prolongar la tasa de vaciado gástrico. Se ha postulado que los cambios químicos que tienen lugar durante la fermentación de la masa madre disminuyen el grado de gelatinización del almidón, lo que explicaría en parte la menor digestibilidad de los alimentos de cereales fermentados con esta masa (Juntunen et al., 2003; Östman, 2003; De Angelis et al., 2006; Maioli et al., 2008).

También pueden existir otros mecanismos para que la masa madre regule el índice glucémico (GI) / índice de insulina (II) de los productos. Por ejemplo, la proteólisis, produciendo una cantidad significativa de péptidos y aminoácidos, los cuales tienen un papel en la regulación del metabolismo de la glucosa. Además de que la fermentación de la masa madre aumenta la cantidad de compuestos fenólicos libres, lo que también puede tener un impacto en la reducción del GI / II (Katina et al., 2007; Nilsson et al., 2007; Solomon y Blannin, 2007; Gänzle et al., 2008).

# Capítulo 5

## Vida de anaquel e inocuidad de los productos elaborados con masa madre.

### 5.1 Duración

En los productos de panadería, el envejecimiento indica una disminución de la aceptación por parte del consumidor causada por cambios en la miga que no son los que resultan de la acción de los organismos de descomposición. La contaminación del pan puede ocurrir de dos maneras: presencia de esporas en la harina (que no se eliminan en el horneado necesariamente) o bien, después del horneado, la distribución de polvo y esporas de moho en el aire es la principal causa del deterioro del pan. Además de las pérdidas económicas, el deterioro del pan también representa un peligro para la salud de los consumidores, especialmente cuando el pan está contaminado con mohos micotoxigénicos. La aplicación de LAB en forma de masa madre tiene un efecto positivo sobre el envejecimiento del pan. Uno de estos efectos es una mejoría en el volumen específico de la barra, que se asocia con la reducción de la tasa de envejecimiento. Los panes que contienen masa madre pueden disminuir la tasa de envejecimiento medido por calorimetría diferencial de barrido (Corsetti et al., 2001).

### 5.2 Actividad antibacteriana y anti-moho

En general, las LAB juegan un papel crucial en la conservación y seguridad microbiana de los alimentos fermentados, promoviendo así la estabilidad microbiana de los productos finales de la fermentación. El pan y otros productos horneados con levadura pueden contaminarse con bacterias o mohos de descomposición. Se ha demostrado que las LAB poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas, por lo que la adición de masa madre es un procedimiento eficaz para evitar que el pan se eche a perder, ya que cumple con la solicitud

del consumidor de productos sin aditivos (Messens y De Vuyst, 2002).

En comparación con la fermentación por levadura de panadería, se ha observado que el uso de la masa madre donde se encuentran *L. sanfranciscensis* y *L. plantarum*, retrasa el envejecimiento del pan al disminuir la tasa de firmeza y retrogradación del almidón (Arora et al., 2021).

### **5.2.1 Actividad antibacterial**

Las BAL asociadas a la masa madre inhiben el crecimiento de otros microorganismos al producir muchas sustancias antimicrobianas, como ácidos orgánicos,  $CO_2$ , etanol, peróxido de hidrógeno, diacetilo, ácidos grasos, ácido feniláctico, reuterina y el antibiótico de baja masa molecular reuteriicina producido por *Lb. reuteri* LTH2584. Entre los ácidos orgánicos, el ácido acético y propiónico producido por LAB heterofermentativas son más efectivos que el ácido láctico, estos ácidos orgánicos, han demostrado ser tan eficaces como el propionato de calcio 0,3% (w / v) en la prevención de la descomposición del pan causada por *Bacillus subtilis* (Höltzel et al., 2000; Valerio et al., 2009).

Solo se han caracterizado unas pocas bacteriocinas o sustancias inhibidoras similares a las bacteriocinas (BLIS) producidas por BAL de masa madre. Incluyen la bavaricina de *L.bavaricus* MI401, la plantaricina ST31 de *Lb. plantarum* ST31 y BLIS C57 de *Lb. sanfranciscensis* C57. Las bacteriocinas LAB han demostrado tener la capacidad de inhibir patógenos transmitidos por los alimentos y / o bacterias que deterioran los alimentos, como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.; por tanto, su uso como aditivos alimentarios o la aplicación de las cepas productoras como cultivo iniciador o protector podría contribuir a la fabricación de productos más seguros. Además, las bacteriocinas pueden conducir a una reducción de los conservadores químicos añadidos utilizados por la industria alimentaria (Messens y De Vuyst, 2002; Gänzle, 2004; Ryan et al., 2008; Valerio et al., 2008).

Las BAL asociadas a la masa madre también son efectivas contra el deterioro conocido como

pan filante (formación de hilos de polímero), inducido por *Bacillus* spp., probablemente debido a la producción de ácidos orgánicos y otras sustancias antibacterianas aún desconocidas (Gänzle et al., 2000; Katina et al., 2002).

### **5.2.2 Actividad anti-moho**

La causa más frecuente de deterioro en los productos horneados está representada por el crecimiento de hongos, que puede causar problemas de salud pública si está involucrada la producción de micotoxinas. Los hongos de descomposición comúnmente asociados con las pérdidas de panadería pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Endomyces*, *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Penicillium* y *Rhizopus*. El ácido caproico producido por *Lb. sanfranciscensis* CB1, junto con una mezcla de acético, fórmico, propiónico, butírico y ácidos n-valéricos, actúan de forma sinérgica, jugando un papel clave en la inhibición del crecimiento de *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Monilia* en el pan. Además, se han logrado purificar y caracterizar 2 compuestos antifúngicos producidos por *Lb. plantarum* ITM21B, identificados como 4-hidroxifeniláctico y ácidos fenilácticos, los cuales, aún conservaban sus actividades fungicidas después del horneado (Lavermicocca et al., 2000; Keshri et al., 2002; Schnürer y Magnusson, 2005; Dal Bello et al., 2007; Ryan et al., 2009).

El ácido feniláctico es el más potente, se demostró que retrasa el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Penicillium roqueforti* hasta 7 días y prolongan significativamente la vida útil del pan. Se ha encontrado que las fungicinas son producidas por cepas de *Lb. casei*, *Lb. pentosus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* y *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis*. (Magnusson y Schnürer, 2001)

### **5.3 Tendencias del uso de la masa madre**

En la siguiente información (Tabla 6) se muestra una recopilación de algunas de las investigaciones y patentes registradas y publicadas en un periodo de tiempo comprendido entre el 2013 y el 2020, permitiendo visualizar las tendencias que hay respecto a la masa madre.

Tabla 6. Investigaciones y patentes más recientes relacionadas a la masa madre.

Año	Título	Aplicación	Fuente
2013	Influencia de la composición de la mezcla de harina en la cinética de fermentación y la hidrólisis del fitato de la masa madre utilizada para hacer injera	La influencia de las mezclas de cereales, sorgo teff blanco, cebada-trigo, y sorgo-trigo rojo, sobre la fermentación cinética durante la fermentación tradicional de la masa para preparar injera , una tortita fermentada tradicional etíope.	Baye et al., 2013.
2013	Las bacterias del ácido láctico y la microbiota de levadura de dieciocho masas madre utilizadas para la fabricación de productos horneados con levadura dulces tradicionales italianos.	Estudio de BAL y la microbiota de levadura de dieciocho masas madre utilizadas para la fabricación de algunos productos horneados con levadura dulces tradicionales italianos mediante el método dependiente del cultivo y la pirosecuenciación.	Lattanzi et al., 2013.
2014	Ecología microbiana de fermentaciones de masa madre: ¿diversa o uniforme?	Estudio que muestra que <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus paralimentarius</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> son bacterias comunes de la masa madre. Por otro lado, <i>Candida humilis</i> , <i>Kazachstania exigua</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> son las levaduras más comunes.	De Vuyst et al., 2014.
2015	Microbiotas de levadura y bacteria del ácido láctico de dieciséis masas madre tradicionales francesas	Dieciséis masas madre utilizadas para la fabricación de panes franceses tradicionales se caracterizaron en condiciones muy ácidas (valor medio de pH 3,5). <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> fue la especie dominante y la levadura dominante fue <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Lhomme et al., 2015.
2017	Nueva formulación de pan con propiedades reológicas mejoradas y una vida útil más larga mediante el uso combinado de transglutaminasa y masa madre	Mejora de la calidad del pan mediante uso combinado de masa madre ( <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> y <i>Candida milleri</i> por su capacidad para mejorar los perfiles de aroma y extender la vida útil del producto final) y la enzima reticulante TGasa (para mejorar la reología).	Scarnato et al., 2017.
2018	Composiciones novedosas de masa madre y métodos para su preparación	Producto de masa madre que comprende cereal mezcladas con hojas de té, fermentado por cepas de bacterias del ácido acético y levadura (cepas de bacterias del género <i>Acetobacter</i> y cepas de levadura	Pauw, 2018.

		<i>Zygonosaccharomyces</i> y/o <i>Brettanomyces</i> )	
2019	Pan sin gluten que contiene algas de la especie <i>Himanthalia elongata</i> y procedimiento de fabricación de dicho pan.	Elaboración de pan sin gluten que contiene algas de la especie <i>Himanthalia elongata</i> y un método de fabricación, a partir de una masa madre sin gluten.	Rodríguez et al., 2019.
2020	El uso de bacterias de ácido láctico antifúngicas de masa madre de avena para mejorar la seguridad y las funcionalidades tecnológicas del pan de trigo suplementado.	Uso de masa madre de avena para aislar <i>Pediococcus pentosaceus</i> , que se identificó como antifúngico, reduciendo de forma significativa la expansión del moho en el pan.	Hajinia et al., 2020.
2020	Información sobre el potencial de las bacterias del ácido láctico relacionadas con la masa madre para degradar las proteínas del trigo	Análisis de BAL ( <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. plantarum</i> y <i>L. paracasei</i> ) que disminuyen la concentración de proteínas inmunogénicas en masa madre (gliadinas y ATI). Permitiendo obtener productos de panificación para celíacos.	Fraberger et al., 2020.
2020	Efecto de las harinas de amaranto y quinoa sobre la producción de exopolisacáridos y el perfil de proteínas de la masa madre líquida fermentada por <i>Weissella cibaria</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i>	Uso de pseudocereales (quinoa y amaranto) así como de las cepas <i>W. cibaria</i> (C43-11) y <i>L. plantarum</i> ITM21B, obteniendo una producción considerable de EPS y proteólisis eficaz. Contribuyendo a la mejora de las características reológicas y funcionales de los productos de panadería.	Valerio et al., 2020

# Conclusiones

La calidad de las materias primas utilizadas en la elaboración del pan es de vital importancia, aportan características que impactan en la calidad del producto terminado; determinan las propiedades reológicas de la masa, contribuyendo a propiedades como: retención de gas, fluidez y dispersión, regulación de temperatura y fermentación, favorecimiento de coloración en la corteza, incremento en capacidad de retención de agua y valor nutritivo.

Por otro lado, respecto a la masa madre, los microorganismos implicados en su elaboración son principalmente BAL que funcionan como acidificantes y las levaduras. Su uso en la fabricación del pan mejora la calidad y la conservación del mismo, aportando vitalidad fermentativa y la acidez necesaria, incrementa la actividad enzimática, reduce el envejecimiento, mejora la textura, incrementa la biodisponibilidad de los minerales y reduce el contenido de fitato. En cuanto a características reológicas, el tiempo de amasado se reduce, disminuye la tenacidad y se reduce la extensibilidad de la masa.

Existen tres tipos de masa madre, la Tipo I se caracteriza por ser elaborada de manera más tradicionales y por realizarle un refrigerio diario continuo, la Tipo II es una preparación semifluida que se caracteriza por largos períodos de fermentación y por último está la de Tipo III que es una preparación seca que contiene LAB resistentes al proceso de secado, haciendo de esta última la más conveniente de usar a nivel industrial.

Las propiedades de la masa madre dependen de factores como: la actividad metabólica de las BAL residentes y de parámetros del proceso.

La tecnología de masa madre, aunque es un proceso tradicional cuando se combina con técnicas de fabricación modernas, podría producir productos más saludables para los consumidores. También se ha demostrado que la masa madre es útil en la producción de panes con una digestibilidad lenta del almidón y, por lo tanto, con respuestas glucémicas bajas.

El uso de masa madre es útil para hacer productos de pan con un mayor nivel de compuestos de sabor, lo que finalmente aumenta la uniformidad en los lotes y la satisfacción del cliente.

La tecnología de masa madre también puede ser útil para reducir o eliminar el nivel de conservadores que se utilizan a menudo en los productos horneados, ya que la masa madre ha mostrado actividad antibacteriana y anti-moho. El uso de la masa madre también se puede extender a otros productos como galletas, pizzas, snacks y también productos con harina multicereales o con FD enriquecido. Por lo tanto, la masa madre podría ser útil para servir a la humanidad con alimentos saludables, sabrosos y convenientes.

Considerando las patentes e investigaciones de años recientes enfocadas a la masa madre, se logra observar un continuo interés de adicionar nuevos componentes a la tradicional masa a base de trigo, incluyendo hojas de té, algas o bien incursionando en el área de los pseudocereales como son el amaranto y la quinoa, los cuales resultan beneficiosos para sectores como el mercado del pan para celíacos.

Finalmente, cabe mencionar que se cumplieron los objetivos establecidos inicialmente, describir a detalle las características y aportes que tiene la masa madre en panificación

# Bibliografía

- AlfaLaval. 2015. *¿Qué es la filtración por membrana?*. [En línea] (Actualizado al 25 de octubre del 2015). Disponible en: <https://www.alfalaval.mx/productos-y-soluciones/separacion/membranas/what-is-membrane-filtration/> [Último acceso el 23 de junio del 2021].
- Amador, A. 2018. *Tesis de licenciatura: Evaluación de métodos de destrucción de la estructura de pan de tradición y del papel de sus ingredientes sobre su evolución*. Ciudad de México: UNAM.
- Anil, M. 2007. Using of hazelnut testa as a source of dietary fiber in breadmaking. *Journal of Food Engineering*. 80:61-67.
- Arora, K., Ameer, H., Polo, A., Di Cagno, R., Rizzello, C., Gobbetti, M. 2021. Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 108,71-83.
- Arroyave, L. y Esguerra, C. 2006. *Utilización de la harina de quinua (Chenopodium quinoa wild) en el proceso de panificación*. [En línea] (Actualizado al 1 de enero del 2006). Disponible en: [https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1136&context=ing\\_alimentos](https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1136&context=ing_alimentos) [Último acceso el 10 de marzo del 2021].
- Assessorato Agricoltura. 2019. *Prodotti tradizionali. Pane di Montecalvo*. [En línea] (Actualizado al 29 de agosto del 2019). Disponible en: <http://www.agricoltura.regione.campania.it/tipici/tradizionali/pane-montecalvo.htm> [Último acceso el 8 de julio del 2021].
- Baches, N. 2019. *Trabajo de fin de grado: Estudios de liberación de plata a partir de nanocompuestos de interés alimentario para producción animal*. Zaragoza: Universidad de Zaragoza.
- Bakerpedia. 2021. Panettone. [En línea] (Actualizado al 17 de diciembre del 2021). Disponible en: <https://bakerpedia.com/processes/panettone/> [Último acceso el 18 de Diciembre del 2021].
- Barclay, A., Petocz, P., McMillan, J., Flood, V., Prvan, T., Mitchell, P., Brand, C. 2008. Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk—a meta-analysis of observational studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(3), 627–637.

- Baye, K., Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Rochette, I., Guyot, J. 2013. Influence of flour blend composition on fermentation kinetics and phytate hydrolysis of sourdough used to make injera. *Food Chemistry*, 138:430-436.
- Bernabé, C., Llin, M. y Pérez, C. 2007. *La masa madre: el secreto del pan*. [En línea] (Actualizado al 8 de febrero del 2007). Disponible en: <https://docplayer.es/6147909-La-masa-madre-el-secreto-del-pan.html> [Último acceso el 10 de marzo del 2021].
- BioMérieux, 2010. *Apiweb [CD-ROM] sistemas miniaturizados API*. [En línea] (Actualizado al 21 de Julio del 2010). Disponible en: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/10\\_SistemasAPI.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_SistemasAPI.pdf) [Último acceso el 14 de Junio del 2021].
- Brennan, C. y Samyue, E. 2004. Evaluation of starch degradation and textural characteristics of dietary fiber enriched biscuits. *International Journal of Food Properties*. 7:647-657.
- Calderon, M., Loiseau, G., Guyot, J. 2003. Fermentation by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 of different combinations of carbohydrates occurring naturally in cereals: consequences on growth energetics and  $\alpha$ -amylase production. *Inter J Food Microbiol*, 80,161–169.
- Callejo, M. 2002. *Industrias de Cereales y Derivados*. Madrid. Ed. AMV-Mundi-Prensa.
- Castañeda, M. 2017. *Tesis de licenciatura: Aislamiento de bacterias ácido lácticas dominantes en queso cotija artesanal madurado*. Ciudad de México: UNAM.
- Cataldi, T., Campa, C., y De Benedetto, G. 2000. Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: the potential is still growing. *Fresenius J. Anal. Chem.* 368, 739–758.
- Cauvain S. 2003. *Bread making: an overview. In bread making improving quality*. Cambridge. Woodhead Publication Ltd. p 14.
- Cave, R., Seabrook, S., Gidley, M., y Gilbert, R. 2009. Characterization of starch by size-exclusion chromatography: the limitations imposed by shear scission. *Biomacromology* 10, 2245–2253.

- Chavan R. y Chavan, S. 2011. Sourdough Technology—A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. *Comprehensive Reviews. In food science and food safety*, 10(3), 169-182.
- Chavan R. y Jana, A. 2008. Frozen dough for bread making – a review. *Intern J Food Sci, Technol Nut*, 2, 9–27.
- Clarke, C., Schober, T., Dockery, P., Ö Sullican, K., Arendt, K. 2004. Wheat sourdough fermentation: effects of time and acidification on fundamental rheological properties. *Cereal Chem*, 81,409–417.
- Cobo, R., Rosas, R., Galvéz, D., Adriano, L. y Vázquez, A. 2019. Native lactic acid bacteria as a starter culture for the production of Mexican cream cheese. *Agronomía mesoamericana*, 30(3), 855-870.
- Contreras, M. 2020. *Tesis de maestría en ciencias: Producción de proteasas por *Pediococcus acidilactici* ATCC: 8042*. Ciudad de México: UNAM.
- Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N., Gobbetti, M. 2001. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *Intern J Food Microbiol*, 64,95–104.
- Corsetti, A. y Settanni, L. 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*. Volume 40(5), 539-558.
- Curiosfera, 2021. *Historia del pan – Origen y evolución*. [En línea] (Actualizado al 1 de marzo del 2021). Disponible en: <https://curiosfera-historia.com/historia-del-pan/> [Último acceso el 10 de marzo del 2021].
- Dal Bello, F., Clarke, C., Ryan, L., Ulmer, H., Schober, T., Ström, K., Sjögren, J., Sinderen, D., Schnürer, J., Arendt, E. 2007. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J Cereal Sci* 45:309–18.
- Dal Bello, F., Walter, J., Hertel, C., Hammes, W. 2001. In vitro study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from *lactobacilli* and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Syst Appl Microbiol* 24:232–37.
- Damager, I., Engelsens, S., Blennow, A., Moller, B., y Motawia, M. 2010. First principles insight into the  $\alpha$ -glucan structures of starch: their synthesis, conformation,

- and hydration. *Chem. Rev.* 110, 2049–2080.
- De Angelis, M., Coda, R., Silano, M., Minervini, F., Rizzello, C., Di Cagno, R., Vicentini, O., De Vincenzi, M., Gobbetti, M. 2006. Fermentation by selected sourdough lactic acid bacteria to decrease coeliac intolerance to rye flour. *J Cereal Sci* 43:301–14.
  - De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, M., Weckx, S. 2014. Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? *Food Microbiology*. 37:11-29.
  - Decock, P. y Cappelle, S. 2005. Bread technology and sourdough technology. *Trends Food Sci Technol* 16:113–20.
  - Di Cagno, R., de Angelis, M., Lavermicocca, P., De Vincenzi, M., Giovannini, C., Faccia, M., Gobbetti, M. 2002. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effect on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl Environ Microbiol* 68:623–33.
  - D.O.P. Italian Food Agency, 2017. *Pane di Altamura D.O.P.* [En línea] (Actualizado al 15 de mayo del 2017). Disponible en: <https://www.dopitalianfood.com/it/marchi-dop-italian-food/altri-prodotti-dop-igp/item/515-pane-di-altamura-d-o-p.html> [Último acceso el 8 de julio del 2021].
  - Edel, A. y Rosell, C. 2007. *DE TALES HARINAS, TALES PANES: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica*. Córdoba. Hugo Báez Editor.
  - Edema, M. y Sanni, A. 2008. Functional properties of selected starter cultures for sour maize bread. *Food Microbiol* 25:616–25.
  - Ferchichi, M., Valcheva, R., Prévost, H., Onno, B., Dousset, X. 2007. Molecular identification of the microbiota of French sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, 24:678-686.
  - Fraberger, V., Ladurner, M., Nemeč, A., Grunwald-Gruber, C., Llame, L., Hochegger, R., Domig, K., D'Amico, S. 2020. Insights into the Potential of Sourdough-Related Lactic Acid Bacteria to Degrade Proteins in Wheat. *Microorganisms*. 8(11): 1-17.
  - García, M. 2010. *Pan de masa madre de San Francisco*. [En línea] (Actualizado al 7 de abril del 2010). Disponible en:

<https://invitadoinvierno.com/pan-de-masa-madre-de-san-francisco/> [Último acceso el 8 de julio del 2021].

- Galle, S., Schwab, C., Dal Bello, F., Coffey, A., Gänzle, M., y Arendt, E. 2012. Comparison of the impact of dextran and reuteran on the quality of wheat sourdough bread. *J. Cereal Sci.* 56, 531–537.
- Gänzle, M. 2004. Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:326–32.
- Gänzle, M., Holtzel, A., Walter, J., Jung, G., Hammes, W. 2000. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Appl Environ Microbiol* 66:4325–33.
- Gänzle, M., Loponen, J., Gobbetti, M. 2008. Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science & Technology*. 19(10) ,513-521.
- Gänzle, M. y Vogel, R. 2002. Contribution of reutericyclin production to the stable persistence of *Lactobacillus reuteri* in industrial sourdough fermentation. *Intern Food Microbiol* 80:31–45.
- García, C., Guerin, M., Souidi, K. y Remieze, F. 2020. Lactic fermented fruit or vegetable juices: past, present and future. *Beverages*. 6(1). 1-31
- Giannou, V., Kessoglou, V., Tzia, C. 2003. Quality and safety characteristics of bread made from frozen dough. *Trends Food Sci Technol* 14:99–108.
- Gómez, M. y Martín, O. 2010. *Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*. [En línea] (Actualizado al 22 de junio del 2021). Disponible en: <https://www.ucm.es/tecnicasgeologicas/cromatografia-liquida-de-alta-resolucion-hplc> [Último acceso el 22 de junio del 2021].
- Guerrero, M. 2019. *Tesis de licenciatura: Contribución de una masa madre tipo III elaborada con exudados de fermentados de cacao en las características físicoquímicas y sensoriales de un pan blanco*. Cuenca. Universidad del Azuay.
- Gullo, M., Romano, A., Pulvirenti, A., Giudici, P. 2003. *Candida humilis*- dominant species in sourdoughs for the production of durum wheat bran flour bread. *Intern J Food Microbiol* 80:55–9.

- Hajinia, F., Sadeghi, A., Mahoonak, A. 2020. The use of antifungal oat-sourdough lactic acid bacteria to improve safety and technological functionalities of the supplemented wheat bread. *J Food Safety*. 1-9.
- Hansen, A. y Schieberle, P. 2005. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends Food Sci Technol* 16:85–94.
- Hansen, H., Andreasen, M., Nielsen, M., Larsen, L., Bach-Knudsen, K., Meyer, A., Christensen, L., Hansen, A. 2002. Changes in dietary fibre, phenolic acids and activity of endogenous enzymes during rye bread-making. *Euro Food Res Technol* 214:33–42.
- Hofmann, T., Schieberle, P. 2000. Formation of aroma-active Strecker aldehydes by a direct oxidation of Amadori compounds. *J Agric Food Chem* 48:4301–5.
- Hölzel, A., Gänzle, M., Nicholson, G., Hammes, W., Jung, G. 2000. The first low molecular weight antibiotic from lactic acid bacteria: reutericyclin, a new tetramic acid. *Angew Chem Intl Edit* 39:2766–8.
- Horgan, R., y L. Kenny. 2011. Omic’ technologies: Genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist* 13:189–195.
- Hu, G., Huang, S., Cao, S., Ma, Z. 2009. Effect of enrichment with hemicelluloses from rice bran on chemical and functional properties of bread. *Food Chemistry*. 115: 839-842.
- Isenberg, S., Brewer, A., Côté, G., y Striegel, A. 2010. Hydrodynamic versus size exclusion chromatography characterization of alternan and comparison to off-line MALS. *Biomacromology* 11, 2505–2511.
- Juntunen, K., Laaksonen, D., Autio, K., Niskanen, L., Holst, J., Savolainen, K., Liukkonen, H., Poutanen, S., Mykkänen, M. 2003. Structural differences between rye and wheat breads but not total fiber content may explain the lower postprandial insulin response to rye bread, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(5), 957–964.
- Katina, K., Heiniö, R., Autio, K., Poutanen, K. 2006. Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. *LWT - Food Science and Technology*. Volume 39, Issue 10, Pages 1189-1202.

- Katina, K., Laitila, A., Juvonen, R., Liukkonen, H., Kariluoto, S., Piironen, V., Landberg, R., Åman, P., Poutanen, K. 2007. Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. *Food Microbiology*, 24(2), 175-186.
- Katina, K., Sauri, M., Alakomi, H., Mattila-Sandholm, T. 2002. Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. *Lebensm Wiss Technol* 35:38–45.
- Keshri, G., Voysey, P., Magan, N. 2002. Early detection of spoilage moulds in bread using volatile production patterns and quantitative enzyme assays. *J Appl Microbiol* 92:165–72.
- Kirchhoff, E. y Schieberle, P. 2001. Determination of key aroma compounds in the crumb of a three-stage sourdough rye bread by stable isotope dilution assays and sensory studies. *J Agric Food Chem* 49:4304–11.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O., Leer, R., Turchini, R., Peters, S., Sandbrink, H., Fiers, M., Stiekema, W., Lankhorst, R., Bron, P., Hoffer, S., Groot, M., Kerkhoven, R., Vries, M., Ursing, B., Vos W., Siezen, R.. 2004. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceed Nat Acad Sci USA* 100:1990–5.
- Korakli, M., Rossmann, A., Ganzle, M., Volgel, R. 2001. Sucrose metabolism and exopolysaccharides production in wheat and rye sourdoughs by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J Agric Food Chem* 49:5194–200.
- Lattanzi, A., Minervini, F., Di Cagno, R., Diviccaro, A., Antonielli, L., Cardinali, G. 2013. The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional Italian sweet leavened baked goods. *International Journal of Food Microbiology*, 163, 71-79.
- Lauro, M., Poutanen, K., Forssell, P. 2000. Effect of partial gelatinization and lipid addition on amylolysis of barley starch granules. *Cereal Chem.*, 77, 595 - 601.
- Lavermicocca, P., Valerio, A., Evidente, S., Lazzaroni, A., Corsetti, A., Gobbetti, M. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from sourdough the *Lactobacillus plantarum* 21B. *Appl Environ Microbiol* 66:84–90.
- Laws, A. y Marshall, V. 2001. The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with rhy strains of lactic acid bacteria. *Intern Dairy J* 11:709–21.

- Lay, J., S. Borgmann, R. Liyanage, and C. Wilkins. 2006. Problems with the “omics.” *Trends in Analytical Chemistry*. 25 (11):1046–1056.
- Lazaridou, A. y Biliaderis, G. 2007. Molecular aspects of cereal  $\beta$ -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *J Cereal Sci*. 46(2):101-18.
- Lhomme, E., Lattanzi, A., Dousset, X., Minervini, F., De Angelis, M., Lacaze, G. 2015. Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of sixteen French traditional sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, 215, 161-170.
- Liu, M., Nauta, A., Francke, C., Siezen, R., 2008. Comparative genomics of enzymes in flavor-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 74:4590–600.
- Liu, S. 2003. Practical implications of lactose and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Intern J Food Microbiol* 83:115–31.
- Lopez, W., Duclos, V., Coudray, C., Krespine, V., Feillet, C., Messenger, A., Demigne, C., Remesy, C. 2003. Making bread with sourdough improves mineral bioavailability from reconstituted whole wheat flour in rats. *Nutrition* 19:524–30.
- Loponen, J. 2006. *Prolamin degradation in sourdoughs*. Helsinki. Department of Food Technology. University of Helsinki.
- Madigan, T., Martinko, J., Dunlap, P. y Clark, D. 2009. *Brok: Biología de los microorganismos*. 12a edición. Madrid. Editorial Pearson Educación S.A.
- Magaña, E., Ramírez, B., Platt, C., López, A., Torres, I., Sánchez, I. 2009. Caracterización viscoelástica de masas de variedades de trigos suaves. *Tecnología, Ciencia, Educación* 24(1):12-22.
- Magnusson, J. y Schnürer, J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl Environ Microbiol* 67:1–5.
- Magnusson, J., Storm, K., Ross, S., Sgogren, J., Schnurer, J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 219:129–35.
- Maioli, M., Pes, G., Sanna, M., Cherchi, S., Dettori, M., Manca, E., Farris, G. 2008. Sourdough-leavened bread improves postprandial glucose and insulin plasma levels in subjects with impaired glucose tolerance. *Acta Diabetol* 45, 91–96.

- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceed Nat Acad Sci USA* 103:15611–6.
- Martinez, V., Trinidad, S., Sachman, B., Ramírez, L y García, M. 2016. Dinámica poblacional y aislamiento de bacterias ácido lácticas en lactosuero fermentado. *Nova Scientia. Revista de investigación de la Universidad De La Salle Bajío*. 8(2). 326-339.
- Mechelke, M., Herlet, J., Benz, J. 2017. HPAEC-PAD for oligosaccharide analysis—novel insights into analyte sensitivity and response stability. *Anal Bioanal Chem* 409, 7169–7181.
- Merck. 2010. Microbiology Manual 12th Edition. [En línea] (Actualizado al 1 de enero del 2010). Disponible en: [http://www.laboquimia.es/pdf\\_catalogo/MERCK\\_Manual\\_de\\_microbiologia\\_12a\\_edicion.pdf](http://www.laboquimia.es/pdf_catalogo/MERCK_Manual_de_microbiologia_12a_edicion.pdf) [Último acceso el 22 de junio del 2021].
- Mesas, J. y Alegre, M. 2002. El pan y su proceso de elaboración. the bread and its processing. o pan e o seu proceso de elaboração. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Vol. 3, No. 5, pp. 307-313.
- Messens, W. y De Vuyst, L. 2002. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs – a review. *Intern J Food Microbiol* 72:31–43.
- Minervini, F., Di Cagno, R., Lattanzi, A., De Angelis, M., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S. y Gobbetti, M. 2012. Microbiotas de levadura y bacteria del ácido láctico de 19 masas madre utilizadas para panes italianos tradicionales / típicos: interacciones entre ingredientes y diversidad de especies microbianas. *Microbiología aplicada y ambiental* , 78 (4), 1251–1264.
- Miralbés, C. 2000. *Enzimas en Panadería*. Barcelona. Ed. Montagud.
- Morozova, O. y Marra, M. 2008. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*. 92(5):255-64.
- Moya, E. 2018. *Tesis de licenciatura: Caracterización de bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos de Villahermosa, Tabasco*. Ciudad de México: UNAM.
- Mugula, J., Nnko, S., Narvhus, J., Sørhaug, T. 2003. Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *Intern J Food Microbiol* 80:187–99

- NCEZID, (National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases). 2013. *The Whole Genome Sequencing (WGS) Process*. [En línea] (Actualizado el 29 de mayo del 2013). Disponible en: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocol-images.html#wgs> [Último acceso el 8 de julio del 2021].
- Nilsson, M., Holst, J., Björck, M. 2007. Metabolic effects of amino acid mixtures and whey protein in healthy subjects: studies using glucose-equivalent drinks. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(4), 996–1004.
- Norma Oficial Mexicana nom-247-ssa1-2008, productos y servicios. cereales y sus productos. cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba.
- Orozco, E. y Guerrero, V. 2016. *Tesis de licenciatura en Ingeniería: Diseño y montaje de un sistema dosificador para galletas tipo cracker fermentadas*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Ortiz, S. 2018. *Tesis de licenciatura: Caracterización de compuestos antimicrobianos tipo bacteriocina producidos por bacterias ácido lácticas aisladas de insectos comestibles*. Ciudad de México: UNAM.
- Östman, E. (2003). *Doctoral thesis: Fermentation as a Means of Optimizing the Glycaemic Index - Food Mechanisms and Metabolic Merits with Emphasis on Lactic Acid in Cereal Products*. Lund: Institute of Technology.
- Park, Y., Jung, L., Jeon, E. 2006. Quality characteristics of bread using sourdough. *J Food Sci Nutrition* 33:323–27.
- Parra, R. 2010. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia*. 8(1). 93-105.
- Pauw, P. 2018. *Composiciones novedosas de masa madre y métodos para su preparación*. [En línea] (Actualizado el 10 de julio del 2018). Disponible en: <https://patents.google.com/patent/ES2675328T3/es?q=masa+madre&before=priority:20210101&after=priority:20000101#citedBy> [Último acceso el 8 de julio del 2021].

- Pérez, N.; Mayor, G.; Navarro, V. 2001. *Procesos de Pastelería y Panadería*. Zaragoza. Ed. Acribia.
- Pizarro C., Ronco, A., Gotteland, M. 2014.  $\beta$ -glucanos: ¿qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud?  $\beta$ -glucans: ¿qué tipos existen y cuáles son sus beneficios para la salud?. *Revista chilena de nutrición* , 41 (4), 439-446.
- Ramírez-López, C. y Vélez, J. Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. *Información Tecnológica*. 27(6). 115-128.
- Reale, A., Di Renzo, T., Boscaino, F., Nazzaro, F., Fratianni, F., Aponte, M. 2019. Lactic Acid Bacteria Biota and Aroma Profile of Italian Traditional Sourdoughs From the Irpinian Area in Italy. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1-15.
- Rehman, S., Paterson, A., Piggott, J. 2006. Flavour in sourdough breads: a review. *Trends Food Sci Technol* 17: 557–66.
- Reinhart, P. 2006. *El aprendiz de panadero, el arte de elaborar un pan extraordinario*. Barcelona. RBA Libros.
- Richards, H. 2017. *Tesis de licenciatura: Estudio de las actividades enzimáticas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos cárnicos madurados*. Ciudad de México: UNAM.
- Ríos, N. y Villanueva, S. 2019. *Tesis de licenciatura: Aislamiento de bacterias ácido lácticas de tracto intestinal de ratón infante y caracterización bioquímica primaria y de perfil de carbohidratos*. Ciudad de México: UNAM.
- Rizo, J., Guillén, D., Farrés, A., Ruiz, G., Sánchez, S., Wachter, C. y Rodríguez, R. 2018. Omics in traditional vegetable fermented foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 60(5):5-15.
- Rodríguez, B. y Armengol, L. 2012. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico Prenat*. 23(2):56-66.
- Rodríguez, M., Tornadijo, P., Combarros, D., Fernandez, J., Fresno, L., Gonzalez, B., Prieto, E., Renes, S. 2019. *Pan sin gluten que contiene algas de la especie Himanthalia elongata y procedimiento de fabricación de dicho pan*. [En línea] (Actualizado el 1 de marzo del 201). Disponible en: <https://patents.google.com/patent/ES2675948B2/es?q=masa+madre&before=priority:20210101&after=priority:20170101> [Último acceso el 8 de julio del 2021].

- Roos, S., Karner, F., Axelsson, L., Jonsson, H. 2000. *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with in vitro mucus-binding activity isolated from pig intestine. *Inter J Syst Evol Microbiol* 50:251–58.
- Ruas, P. y de los Reyes, C. 2005. Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 88, 843–856.
- Rubio, S., Pacheco, R., Gómez, A., Perdomo, S. y García, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Médica*, 61(2).
- Rupesh, S. y Shraddha, R. 2011. Sourdough Technology—A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol.10.170-180.
- Ryan, L., Bello, F., Czerny, M., Koehler, P., Arendt, E. 2009. Quantification of phenyllactic acid in wheat sourdough using high resolution gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 57:1060–4.
- Sabanis, D., Lebesi, D., Tzia, C. 2009. Effect of dietary fiber enrichment on selected properties of gluten -free bread. *Food Science and Technology*. 1-10.
- Salmenkallio, M., Katina, K., Autio, K. 2001. Effect of bran fermentation on quality and microstructure of high-fibre wheat bread. *Cereal Chem* 78:429–35.
- Sánchez, B., Ruiz, L., Gueimonde, M., y Margolles, A. 2013. Omics for the study of probiotic microorganisms. *Food Research International*. 54 (1):1061–1071.
- Sánchez, J., Martínez, B., Guillén, R., Jiménez-Díaz, R., y Rodríguez, A. 2006. Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7495–7502.
- Sanz, M. y Martínez-Castro, I. 2007. Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. *J. Chromatog. A* 1153, 74–89.
- Saucedo, N. 2017. *Tesis de licenciatura: Efecto de las bacterias ácido lácticas termotolerantes sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de batidos cárnicos cocidos*. Ciudad de México: UNAM.
- Scarnato, L., Montanari, C., Serrazanetti, D., Aloisi, I., Balestra, F., Del Duca, S., Lanciotti, R. 2017. New bread formulation with improved rheological properties and

longer shelf-life by the combined use of transglutaminase and sourdough, *LWT-Food Science and Technology*. 81:101-110.

- Schnürer, J. y Magnusson, J. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci Technol* 16:70–8.
- Simpson, J., McCracken, V., Gaskins, H., Mackie, R. 2000. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Appl Environ Microbiol* 66:4705–14.
- Solomon, T. y Blannin, A. 2007. Effects of short-term cinnamon ingestion on in vivo glucose tolerance. *Diabetes Obesity and Metabolism*, 9(6), 895-901
- Speranza, B., Bevilacqua, A., Corbo, M., Altieri, C., y Sinigaglia, M. 2015. Selection of autochthonous strains as promising starter cultures for *Fior di Latte*, a traditional cheese of southern Italy. *Journal of the science of Food and Agriculture*, 95(1), 88-97.
- Succi, M., Reale, A., Andrighetto, C., Lombardi, A., Sorrentino, E., Coppola, R. 2003. Presence of yeasts in Southern Italian sourdoughs from *Triticum aestivum* flour. *FEMS Microbiol Lett* 225:143–8
- Thiele, C., Gänzle, M., Vogel, R. 2002. Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor. *Cereal Chem* 79:45–51.
- Tiekling, M., Ehrmann, M., Vogel R., Gänzle, M. 2003a. Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl Microbiol Technol* 66:665–3.
- Tiekling, M., Kaditzky, S., Gänzle, M., Vogel, R. 2003b. Biodiversity and potential for baking applications of glycosyltransferases in lactobacilli for use in sourdough fermentation. In: de Vuyst L, editor. *Sourdough, from fundamentals to applications*. Brussels : Vrije Univ. Brussel (VUB), IMDO. p 58–9.
- Tiekling, M., Korakli, M., Ehrmann, M., Gänzle, M., Vogel, R. 2003c. In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 69:945–52.
- Torino, M., Font de Valdez, G., Mozzi, F. 2015. Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*. 6: 1-10.

- Ua-Arak, T., Jakob, F., Vogel, R. 2017. Influence of levan-producing acetic acid bacteria on buckwheat-sourdough breads. *Food Microbiology*, 65:95-104.
- Valdés, A. 2014. *Tesis de licenciatura: identificación de bacterias ácido lácticas aisladas de un queso madurado mexicano*. Ciudad de México: UNAM
- Valerio, F., Bavaro, A., Di Biase, M., Lonigro, S., Logrieco, A., Lavermicocca, P. 2020. Effect of Amaranth and Quinoa Flours on Exopolysaccharide Production and Protein Profile of Liquid Sourdough Fermented by *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Frontiers in Microbiology*. 11:1-14.
- Valerio, F., De Bellis, P., Lonigro, S., Visconti, A., Lavermicocca, P. 2008. Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread-making to prevent *Bacillus subtilis* ropy spoilage. *Inter J Food Microbiol* 122:328–32.
- Valerio, F., Favilla, M., De Bellis, P., Sisto, A., de Candia, S. y Lavermicocca, P. 2009. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 438–448.
- Vanningelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings, J. 2004. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 900–912.
- Veraverbeke WS, Delcour JA. 2002. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *CRC Crit Rev Food Sci Nutri* 42:179–208.
- Vogel, R., Ehrmann, M., Gänzle, M. 2002. Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sourdough ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:631–38.
- Volman, J., Ramakers, J., Plat J. 2008. Dietary modulation of immune function by  $\beta$ -glucans. *Physiol Behav.* 94(2):276-84.
- Volonté, M. y Quiroga, P. 2013. *Análisis Farmacéutico*. La Plata: Universidad de la Plata, Edulp. p 78-82.
- Vuyst, L., de Vin, F., Vanningelgem, F., Degeest, B. 2001. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Intern Dairy J* 11:687–707.

- Wang, J., Rosell, C., de Harder, C. 2002. Effect of the addition of different fibres on wheat dough performance and bread quality. *Food Chemistry*. 79:221-226.
- Wieser H. 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbio*. 24:115–19.
- Wood, P. 2007. Cereal  $\beta$ -glucans in diet and health. *J Cereal Sci*. 46(3):230-8.
- Yazar, G. y Tavman, Ş. 2012. Functional and Technological Aspects of Sourdough Fermentation with *Lactobacillus sanfranciscensis* . *Food Eng Rev*. 4, 171–190.
- Zanella, D. 2014. *Ingredientes del Pan y su Función en la Panificación*. [En línea] (Actualizado en 2014). Disponible en: <https://es.calameo.com/books/003019853f179044bb75b#:~:text=De%20acuerdo%20a%20su%20funci%C3%B3n,%2Dagar%2C%20gelatina%2C%20tragacanto>. [Último acceso el 25 de marzo del 2021].
- Zeppa, G., Conterno, L. y Gerbi, V. 2001. Determinación de ácidos orgánicos, azúcares, diacetilo y acetoína en queso mediante cromatografía líquida de alta resolución. *J. Agric. Food Chem*. 49, 2722–2726.
- Zhang, G., Zhang, W., Sadiq, F., Arbab, S., He, G. 2019. Microbiota succession and metabolite changes during the traditional sourdough fermentation of Chinese steamed bread. *CyTA - Journal of Food*, 17:172-179.