



Sistema Nacional de Educación Superior Tecnológica



Dirección General de Educación Superior Tecnológica



FERMENTACIÓN DE MASAS POR BACTERIAS
ÁCIDO LÁCTICAS CON ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA,
PARA LA ELABORACIÓN DE PAN BLANCO.

TESIS

Que para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

María Roxana Jiménez Salinas

Dra. María Eva Rodríguez Huevo, Directora de Tesis

Dra. Ruth Pedroza Islas, Asesora de Tesis

Ecatepec de Morelos, Estado de México, noviembre del 2011



GOBIERNO DEL
ESTADO DE MÉXICO

AVISO DE TERMINACIÓN DE PROYECTO
DE TESIS

TIT04-ANEXO PM



DIRECCIÓN ACADÉMICA

DIVISIÓN ACADÉMICA DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO: MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Folio: MCIBQ/2009/JISM800427

Fecha: 11 de Noviembre del 2011

Después de las revisiones, observaciones y seguimiento de recomendaciones hechas al proyecto de tesis: **FERMENTACIÓN DE MASAS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CON ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA PARA LA ELABORACIÓN DE PAN BLANCO**, que como requisito para obtener el grado de maestría presenta

JIMÉNEZ

Apellido paterno

SALINAS

Apellido materno

MARÍA ROXANA

Nombres (s)

Matrícula: 200921292

El Director de Proyecto Dra. MARÍA EVA RODRÍGUEZ HUEZO da por concluido su desarrollo para proceder a la impresión del trabajo correspondiente y la defensa pública del mismo.

Vo. Bo. COMITÉ TUTORIAL

[Handwritten Signature]

Dra. María Eva Rodríguez Huevo
Director

[Handwritten Signature]

Dr. Alfonso Totosa Sánchez
Asesor

[Handwritten Signature]

Dra. Ruth Pedroza Islas
Asesor externo

[Handwritten Signature]

Dra. María Aurora Martínez Trujillo
Asesor



Elaboró: <i>[Handwritten Signature]</i> Dra. María Eva Rodríguez Huevo Director de Proyecto	Revisó: <i>[Handwritten Signature]</i> Dr. Ignacio García Martínez Coordinador de Posgrado	Vo. Bo.: <i>[Handwritten Signature]</i> M. en IQ. Judith Cervantes Ruiz Jefe de División
--	---	---



GOBIERNO DEL
ESTADO DE MÉXICO

DICTAMEN DE LIBERACIÓN DE
PROYECTO DE TESIS
TIT05-ANEXO PM



DIRECCIÓN ACADÉMICA
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE POSGRADO MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Fecha: 11 de Noviembre del 2011.

Datos generales
Nombre del alumno:

JIMÉNEZ

SALINAS

MARIA ROXANA

Apellido paterno

Apellido materno

Nombres (s)

Matrícula: 200921292

PROYECTO: FERMENTACIÓN DE MASAS POR BACTERIAS ACIDO LACTICAS CON
ACTIVIDAD PROTEOLITICA PARA LA ELABORACIÓN DE PAN BLANCO

DIRECTOR: Dra. MARIA EVA RODRÍGUEZ HUEZO

Dictamen:

Con base en el registro No. MCIBQ/2009/JISM800427 correspondiente al periodo escolar 2009-02, asignado al proyecto de tesis FERMENTACIÓN DE MASAS POR BACTERIAS ACIDO LACTICAS CON ACTIVIDAD PROTEOLITICA PARA LA ELABORACIÓN DE PAN BLANCO y presentado por la alumna referida; y después de haber sido desarrolladas las actividades requeridas, el Comité Tutorial, conformado por los integrantes que firman al calce, ha determinado que SI (X) NO () han sido cubiertos en su totalidad los requisitos que permitan a esta División Académica liberar al alumno de los trámites académicos para tal efecto e iniciar el trámite de obtención de grado de maestría en la Unidad de Registro y Certificación de este Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec.

Observaciones:

Comité Tutorial

[Handwritten signature]

Dra. María Eva Rodríguez Huezó

Director

[Handwritten signature]

Dr. Alfonso Totosaús Sánchez

Asesor

[Handwritten signature]
Dra. Ruth Pedroza Islas
Asesora externa



[Handwritten signature]
Dra. María Aurora Martínez Trujillo

Asesora

Elaboró: <i>[Handwritten signature]</i> Dr. Ignacio García Martínez Coordinador de Posgrado	Revisó y Visto Bueno: <i>[Handwritten signature]</i> M. en IQ. Judith Cervantes Ruiz Jefe de División	Enterado: <i>[Handwritten signature]</i> M. en A. Alfonso Martínez Reyes Director Académico
--	--	--



El Posgrado de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica del Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado, con categoría de Alto Nivel, con el número de referencia 1665-0.

Esta Tesis fue realizada con el apoyo de la Beca 36131 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Fermentación de masas por bacterias ácido-lácticas con actividad proteolítica, para la elaboración de pan blanco

Agradecimientos

Doy gracias a Dios por haberme dado la entereza para llegar a término con este proyecto.

Agradezco el apoyo económico brindado por parte de Conacyt, sin el cual no hubiera sido posible la realización de este proyecto.

Gracias también a todas aquellas personas que dentro del TESE me brindaron su apoyo incondicional, para realizar parte experimental, principalmente al Profesor José Manuel Mejía Islas, coordinador de los laboratorios de docencia.

Agradezco a la Dra. Ruth Pedroza Islas de la Universidad Iberoamericana por su apoyo al proveernos de reactivos para realizar la electroforesis así como el permitirme el acceso al laboratorio de alimentos.

A la Dra. Arely Prado Barragán y a Ricardo ambos de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa mil gracias por su asesoría sobre la técnica de electroforesis.

Agradezco igualmente al Dr. Jaime Vernon Carter de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa por permitir hacer uso del laboratorio de Bioprocesos del cual es responsable.

Angeles Charles, Gerardo Avilés y Luis Soto por su ayuda incondicional para las mediciones de textura de los panes.

Por último y no con menos importancia agradezco a la Dr. Eva Rodríguez Huevo, por su apoyo, paciencia y dedicación, por la seriedad y compromiso que mostró durante el proyecto.

También, agradezco a mis revisores de tesis sus observaciones y el tiempo que dedicaron a la lectura de este trabajo.

Dedicatorias

Este proyecto está dedicado a todas las personas que de alguna manera me brindaron su apoyo, dedicando un poco de su tiempo. Para mi familia por su paciencia, a mi hermana Mary por cuidar a mí niña MaryFer, porque la ha cuidado con tal esmero que se ha ganado el título de mamá Mary, le doy gracias por todo ese amor y paciencia que le dedicó a Maryfer y también le doy gracias a la vida por tener una hermana como ella. A mis amigos gracias.

Índice

0	Resumen y Abstract.....	xi
0.1	Resumen	xxi
0.2	Abstract	xixi
1	Introducción.....	1
2	Justificación.....	3
3	Objetivos	4
3.1	Objetivo general	4
3.2	Objetivos particulares	4
4	Antecedentes	5
4.1	Características generales de las bacterias ácido-lácticas	6
4.1.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	7
4.1.2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	8
4.1.3	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	9
4.2	Rutas metabólicas de las bacterias ácido-lácticas.....	10
4.3	Masas fermentadas	12
4.3.1	Definición	12
4.3.2	Beneficios obtenidos por la adicción de bacterias ácido-lácticas en los alimentos.....	12
4.4	Trigo.....	13
4.4.1	Historia del trigo	13
4.4.2	Producción de trigo en México.....	14
4.4.3	Composición y valor nutricional.....	16
4.4.4	Harina de trigo comercial	18
4.4.5	Proteínas de la harina de trigo	19
5	Materiales y Métodos	22
5.1	Materias primas	22
5.2	Crecimiento de bacterias ácido lácticas (<i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. sanfranciscensis</i>).....	22
5.2.1	Curva de crecimiento por conteo en placa	23
5.2.2	Cultivo de células para inocular en las masas	23
5.2.3	Determinaciones fisicoquímicas a la harina de trigo	24
5.2.4	Determinación de proteína total por el método de Kjeldhal	24
5.3	Formulación y fermentación de las masas	25
5.3.1	Conteo de células viables en las masas.....	26
5.4	Estudios del grado de proteólisis en las masas fermentadas	27
5.4.1	Determinación de pH y acidez titulable ATT	27
5.4.2	Extracción de las fracciones proteicas para las determinaciones de Nitrógeno Amino Primario y electroforesis	27
5.4.3	Método de Nitrógeno Amino Primario por TNBS	28

5.4.4	Técnica de separación de péptidos: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS).....	29
5.5	Elaboración de pan blanco.....	30
5.5.1	Determinación de volumen específico.....	31
5.5.2	Análisis de Perfil de Textura (APT) en Pan blanco.....	32
5.5.3	Color en pan.....	35
5.5.4	Evaluaciones fisicoquímicas (humedad, cenizas y proteína).....	36
5.5.5	Análisis Estadístico.....	36
6	Resultados y Discusión.....	37
6.1	Curvas de crecimiento de las bacterias-ácido lácticas.....	37
6.2	Estudios de grado de proteólisis en las masas fermentadas.....	37
6.2.1	Evaluación de la disminución de pH.....	38
6.2.2	Evaluación del porcentaje de ácido láctico.....	39
6.2.3	Análisis de Nitrógeno Amino Primario.....	40
6.2.4	Análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS).....	42
6.3	Evaluaciones al pan blanco.....	44
6.3.1	Análisis de Perfil de Textura (APT) de los panes.....	44
6.3.2	Análisis de volumen específico de los panes.....	46
6.3.3	Análisis de color de pan blanco.....	47
6.3.4	Análisis de humedad.....	48
6.3.5	Análisis de cenizas.....	49
6.3.6	Análisis de proteína.....	50
6.3.7	Calidad de miga de pan blanco.....	51
7	Conclusiones.....	52
8	Bibliografía.....	54
9	Apendices.....	60
9.1	Preparación de soluciones.....	60
9.1.1	Soluciones para el método de TNBS.....	60
9.1.2	Soluciones para (PAGE-SDS).....	61
9.1.3	Pesos moleculares de referencia.....	62
9.2	Curvas patrón.....	63
9.2.1	Curva estándar de L-leucina.....	63
9.2.2	Curva de referencia para estimar los PMs.....	63

Índice de Tablas

Tabla 1. Características generales de las bacterias ácido-lácticas.....	5-6
Tabla 2. Composición química aproximada de los granos de cereales (g/100 g de porción comestible.....	17
Tabla 3. Composición nutricional del trigo y sus componentes.....	19
Tabla 4. Clasificación del trigo con base en sus características generales de calidad y uso industrial.....	20
Tabla 5. Composición química de la harina de trigo con diferentes grados de extracción (% de extracto seco).....	21
Tabla 6. Proteínas presentes en las fracciones de Osborne.....	22
Tabla 7. Clasificación de las proteínas del trigo de acuerdo a su funcionalidad.....	23
Tabla 8. Formulación de las masas.....	28
Tabla 9. Formulación de pan blanco.....	33
Tabla 10. Evaluación de la disminución de pH.....	42
Tabla 11. Evaluación del porcentaje de ácido-láctico.....	43
Tabla 12. Análisis de Nitrógeno Amino Primario.....	44
Tabla 13. Resultados de Análisis de Perfil de Textura (APT) de los panes....	48
Tabla 14. Volumen específico de los panes.....	49
Tabla 15. Color de la superficie de los panes.....	50
Tabla 16. Evaluación del porcentaje de humedad.....	51
Tabla 17. Evaluación del porcentaje de cenizas.....	52
Tabla 18. Evaluación del porcentaje de proteína.....	52

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Lactobacillus brevis</i>	8
Figura 2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	9
Figura 3. <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	11
Figura 4. Rutas metabólicas de las bacterias ácido-lácticas.....	12
Figura 5. Estadísticas de los principales estados de la Republica Mexicana productores de trigo (SAGARPA.2007).....	15
Figura 6. Componentes del grano de trigo	16
Figura 7. Diagrama de extracción de las fracciones proteicas de la masa de trigo	30
Figura 8. Volunómetro National MFGCO.....	34
Figura 9. Texturómetro TATX-PLUS.....	35
Figura 10. Rebanadora Profesional de pan.....	36
Figura 11. Curva Típica de Análisis de Perfil de Textura.....	37
Figura 12. Curva de crecimiento de las bacterias ácido-lácticas y pH.....	40
Figura 13. Curva de crecimiento de UFC/ml vs tiempo.....	41
Figura 14. Fracciones proteicas de las masas en el tiempo 0 de fermentación, analizadas en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS).....	45
Figura 15. Fracciones proteica de las masas después de 24 horas de fermentación, analizadas en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS).....	46
Figura 16. Imagen de panes elaborados.....	50
Figura 17. Imagen de las rebanadas de pan.....	53
Figura 18. Pesos moleculares de referencia.....	62
Figura 19. Curva estándar de L-leucina.....	63
Figura 20. Curva de referencia para estimar los PMs.....	63

0 Resumen y Abstract

0.1 Resumen

Se elaboraron las masas agrias (MA) por fermentación con *L. brevis*, *L. plantarum* y *L. sanfranciscensis*. Se estimó la proteólisis de MA (24 h de fermentación) por la concentración del nitrógeno amino primario (NAP). Como controles se produjo una masa acidificada químicamente y otra sin ningún agente acidificante, para considerar la actividad proteolítica de las enzimas de la harina. A las MA se les determinó el contenido de células, pH, % acidez, distribución de las proteínas (albúminas, globulinas y gliadinas) extraídas secuencialmente de acuerdo a su solubilidad, y su análisis por electroforesis PAGE-SDS. Todas las MA tuvieron entre 1.15×10^9 y 1.6×10^9 UFC/g, su pH disminuyó y su % acidez aumentó significativamente después de 24 h de fermentación. La fermentación de las MA con lactobacilos resultó en una degradación proteínica diferenciada en función del tipo de microorganismo. El valor de NAP varió de mayor a menor como: *L. sanfranciscensis* (3467.74 mg/kg) > *L. brevis* (2953.48 mg/kg) > masa acidificada (2608.87 mg/kg) > *L. plantarum* (2370.97 mg/kg) > masa sin ningún agente acidificante (1951.61 mg/kg). Se demostró que el grado de proteólisis en las masas agrias con lactobacilos fue mayor usando *L. sanfranciscensis* y *L. brevis* que el obtenido por acidificación química.

A partir de las masas agrias se elaboraron panes, mostrando color, olor y sabor característico de productos fermentados, conteniendo un mayor porcentaje de humedad los elaborados con las MA, principalmente los inoculados con *L. sanfranciscensis* y *L. brevis*. Se determinó el volumen específico a los panes, y el % de proteína no presentando diferencia significativa. Respecto a la textura de los panes, los elaborados con MA presentaron una menor suavidad, sin embargo, todos los tratamientos presentaron una elasticidad mayor al 80%, respecto a la resiliencia no presentaron diferencia significativa los adicionados con BAL y el control, pero el tratamiento adicionado con ácido láctico fue diferente a todos, presentando la mayor resiliencia.

0.2 Abstract

Sourdoughs (SD) were prepared by fermentation with *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sanfranciscensis*. SD proteolysis (24 h of fermentation) was estimated quantifying the production of primary amino nitrogen (PAN). Two controls were elaborated: one acidified chemically with lactic acid, and another without any acid or lactic acid bacteria, in order to evaluate the proteolysis by enzymes contained intrinsically in the flour. SD cells count, pH, % acidity, proteins distribution (albumins, globulins, and gliadinas) sequentially extracted based on their solubility, and analyzed by SDS-PAGE electrophoresis, were determined. All the SD had in between 1.15×10^9 and 1.6×10^9 CFU/g, and exhibited a significant drop in pH, and increase in % acidity after 24 h of fermentation. PAN values were from higher to lower: *L. sanfranciscensis* (3467.74 mg/kg) > *L. brevis* (2953.48 mg/kg) > SD added with lactic acid (2608.87 mg/kg) > *L. plantarum* (2370.97 mg/kg) > plain SD (1951.61 mg/kg). It was demonstrated that SD made with lactobacilli exhibited a significantly higher degree of hydrolysis, protein fractions hydrolysis was differentiated.

Bread was produced from the SD which exhibited characteristic color, odor and flavor of fermented products, and those made with *L. sanfranciscensis* and *L. brevis* also had higher moisture content. The SD breads did not show significant differences in the specific volume and % protein. SD bread had lower softness but same resilience as those made with LAB and the controls. The treatment made with lactic acid was more resilient. All the treatments had an elasticity of over 80 %.

1 Introducción

La fermentación de masas agrias es un proceso tradicional usado en la industria de panificación para mejorar la calidad y el sabor de los productos horneados. La adición de masas agrias en la panificación afecta en diferentes maneras las propiedades finales del producto. En el transcurso de la fermentación, tienen lugar muy diversas actividades metabólicas y cada una de ellas, es responsable de los cambios que ocurren en las características de la harina de trigo que generan un mayor volumen de la hogaza, el retraso en la retrogradación, mejor sabor y aroma, mayor valor nutrimental, un menor índice glicémico y mayor vida útil del pan por la inhibición de los microorganismos de deterioro (Thiele y col., 2004; Zotta y col., 2006; Gänzle y col., 2008).

Diversos estudios sobre la microbiología de la fermentación de las masas agrias han mostrado que, además de la producción de ácidos orgánicos y CO₂, se producen bacteriocinas, compuestos antifúngicos y exopolisacáridos que pueden contribuir al volumen y la suavidad de la miga. Además ocurren muy diversos procesos de degradación, por ejemplo sobre las fracciones de gliadina del gluten, lo que abre nuevas perspectivas de aplicación de las masas agrias en temas de la salud (Lacaze y col., 2007). Los microorganismos que participan en la fermentación de las masas agrias son diversos y han sido aislados e identificados, siendo los de mayor prevalencia las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus*, sobresaliendo *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. sanfranciscensis* (León y col., 2006).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) degradan los carbohidratos presentes en la harina de trigo y producen ácido láctico disminuyendo el pH a valores alrededor de 4. Las bacterias homofermentativas, como *L. plantarum*, sintetizan solo ácido láctico sin liberar CO₂, mientras que las heterofermentativas, como *L. brevis* y *L.*

Fermentación de masas por bacterias ácido-lácticas con actividad proteolítica, para la elaboración de pan blanco

sanfranciscensis, además de ácido láctico producen etanol, ácido acético y CO₂ (León y col., 2006); esta última produce además un exopolisacárido que mejora la textura del pan (Korakli y col., 2001).

Durante la fermentación, las BAL pueden exhibir cierta actividad proteolítica específica de cada cepa y se dice que juegan solamente un papel menor en los eventos proteolíticos totales durante la fermentación (Thiele y col., 2004).

Por ello se estudiaron los cambios inducidos en las masas agrias por cada una de las tres cepas de lactobacilos, *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. sanfranciscensis*, comparados con los producidos por acidificación con ácido láctico en las masas agrias.

Panes elaborados con masas fermentadas, presentan un olor y sabor característico de productos fermentados, la degradación de proteínas ocurre durante la fermentación de la masa, generándose un mayor número de aminoácidos, que son los responsables del olor y sabor (Gänzle y col., 2008).

La textura, apariencia y sabor son tres componentes para determinar la aceptabilidad de un alimento, la textura es medida de manera subjetiva por un instrumento que imita la masticabilidad, dando como resultados una curva típica de Análisis de Perfil de Textura (Bourne, 1978).

2 Justificación

La contribución del presente trabajo, va enfocado a la población en México que gusta del consumo de pan, buscando cubrir una dieta más flexible, pragmática, sujeta a modas y estereotipos. El consumidor está buscando productos de mayor calidad, versátiles, frescos y saludables. Esto porque la población mexicana se ha visto afectada por diversos factores tales como malos hábitos alimenticios, sedentarismo y sobrepeso; lo que nos ha llevado de acuerdo a estadísticas presentadas por el (INEGI) en 2008 a tener una tasa de incidencia de diabetes mellitus tipo II de 371.55 personas por cada cien mil. Por lo que dicha enfermedad se coloca como la primera causa de muerte en México desde el 2000. Siendo los estados de Distrito Federal, Coahuila, Morelos, Guanajuato, y Michoacán los que presentan la mayor tasa de mortalidad.

Ahora no solo debemos crear productos que sean prácticos sino, que también nos ayuden a contrarrestar los problemas de salud que se están presentando en la población mexicana, sin olvidar que somos el país con el mayor número de personas obesas.

Una alternativa para cubrir estas necesidades, es la producción de pan de trigo, elaborado con masas fermentadas, adicionando BAL. Las bacterias ácido-lácticas con actividad proteolítica tienen gran importancia en la fabricación de productos a partir de trigo, debido a que han sido reportados los siguientes beneficios:

Mejora la calidad del pan prolongando su vida útil por inhibición de microorganismos, retarda el envejecimiento, mejores características sensoriales (color, olor y sabor del pan), mejoramiento en la calidad nutricional debido a la hidrólisis de agentes quelantes como el ácido fítico incrementando la biodisponibilidad de minerales, los panes elaborados a partir de masas agrias tienen un bajo índice glicémico (IG), los cuales son recomendados para personas con problemas de diabetes.

En el presente trabajo, se evaluó la actividad proteolítica de distintas BAL en masas de panificación y se formularon panes a partir de las mismas, para su evaluación.

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluación de la actividad proteolítica de bacterias ácido-lácticas en masas agrias para la elaboración de productos horneados y su evaluación fisicoquímica y sensorial.

3.2 Objetivos particulares

Estimar la proteólisis en términos de la concentración de NAP, en las masas antes y después de la fermentación.

Separar las fracciones proteicas de la masa para identificar la formulación donde hubo mayor grado de hidrólisis, por medio de electroforesis.

Evaluar parámetros fisicoquímicos, sensoriales y de textura al producto terminado.

4 Antecedentes

4.1 Características generales de las bacterias ácido-lácticas

Las bacterias ácido lácticas, pertenecen al grupo de las Gram-positivas, no forman esporas, son anaerobias tolerantes, sobreviven adecuadamente en medio ácido, carecen de citocromo, su producción final es principalmente ácido láctico durante la fermentación de carbohidratos; dentro de este grupo se incluyen los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Salminen, 1993). Las bacterias ácido lácticas sintetizan su ATP en la fermentación láctica de los glúcidos (Casp y Abril, 1999).

Tabla 1. Características generales de las bacterias ácido-lácticas.

Bacterias	Células procariotas	
Forma	Cocos o bacilos (0.5 μm diámetro a 10 μm largo), solos o en cadena.	
Tipo	Gram-positivas	
Movilidad	No, no tienen flagelos	
Esporulación	No	
Metabolismo	Fermentativo, no respiración	
Temp. de crecimiento	10°- 45° C	
Forma de respiración:	Anaerobias Tolerantes, no necesitan O ₂ pero no les es toxico.	
Oxidasa	Negativa	
Catalasa	Negativa	
Nitrato reductasa	Negativa	
Requerimientos nutritivos	Aminoácidos, vitaminas, etc., viven en hábitats ricos en nutrientes.	
Características bioquímicas		
Homofermentativas (homoláctica)	Heterofermentativas (heteroláctica)	
La fase inicial de la fermentación de los azúcares es la glicolisis, vía de	La fase inicial es la glucosa-6-fosfato, por la vía de las pentosas-fosfato.	

Fermentación de masas por bacterias ácido-lácticas con actividad proteolítica, para la elaboración de pan blanco

Embden-Meyerhof-Parnas		
Productos de la fermentación:		
Ácido láctico	Ácido láctico, ácido acético, CO ₂ , etanol	
Grupos		
Homofermentativas obligatoria	Homofermentativas facultativas	Heterofermentativas obligados
<i>L. amylovorus</i> <i>L. Acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. fasciminis</i> <i>L. mindensis</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. amylolyticus</i>	<i>L. plantarum</i> <i>L. pentosus</i> <i>L. casei</i> <i>L. alimentarius</i> <i>L. paralimentarius</i>	<i>L. acidifarinea</i> <i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. fructivorans</i> <i>L. frumenti</i> <i>L. hilgardii</i> <i>L. panis</i> <i>L. pontis</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rossiae</i> <i>L. sanfranciscensis</i> <i>L. siliginis</i> <i>L. spicheri</i> <i>L. zymae</i>

Fuentes: (Axelsson, 1993; Bordons, 1997; Casp y Abril, 1999; Zamudio y Karin, 2005; Corsetti y Sattanni, 2007).

4.1.1 *Lactobacillus brevis*

Bacilos heterofermentativos generalmente cortos y rectos, miden 0.7-1.0 µm por 2.0-4.0 µm. Colonias rugosas o intermedio, plana, puede ser casi transparente, como se muestra en la figura 1. Aunque generalmente no presentan pigmentación, algunas cepas pueden estar pigmentadas de naranja a rojo. Temperatura óptima de crecimiento de 30 ° C. Aislado de leche, quesos, productos de tomate echado a

Fermentación de masas por bacterias ácido-lácticas con actividad proteolítica, para la elaboración de pan blanco

perder, de masa fermentada, ciertos suelos, estiércol de vaca y de la boca y tracto intestinal de los humanos y ratas (Buchanan y Gibbons, 1974).

León y colaboradores en el 2006, realizaron un estudio para determinar si existe efecto estadísticamente significativo al emplear aislados de BAL silvestres como *L. sp.*LBM9 y *L. brevis* LBM13 combinadas con levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* con respecto al pan control (sin BAL), en las propiedades de la masa y del producto terminado. Determinaron las propiedades fisicoquímicas (aumento de volumen, pH, acidificación de la masa, porcentaje de proteína) y la textura del pan. Concluyendo que las BAL más adecuadas para panificación son los aislados *L. sp.* LBM9 y *L. brevis* LBM13, los cuales descienden el pH y aumentan la acidez de las masas, disminuyen el porcentaje proteico y retrasan el endurecimiento. Para ello realizaron curvas de crecimiento de las cepas, usaron la tecnica de recuento en placa de Unidades Formadores de Colonias/cm³ (UFC/cm³) en Agar MRS y por turbidimetría. Cada cepa se inoculó en caldo MRS, se incubó a 35 ± 2°C, en cámaras de anaerobiosis y cada hora se tomaron dos alícuotas, una para el recuento en superficie y otra para determinar la absorbancia a 550 nm, para realizar la curva de crecimiento.

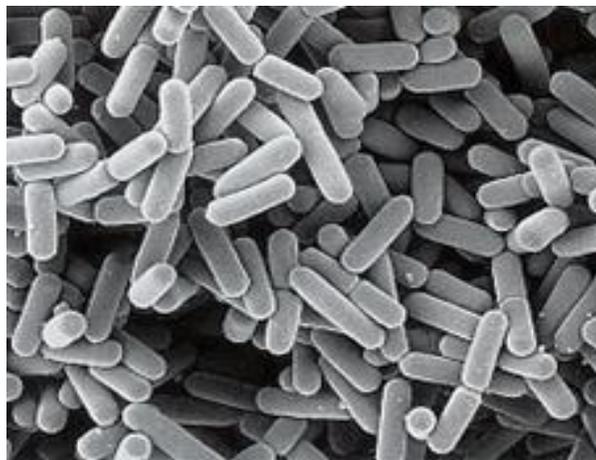


Figura 1. *Lactobacillus brevis*

4.1.2 *Lactobacillus plantarum*

Bacilos con terminaciones redondas, rectos, generalmente miden 0.9-1.2 μm de ancho por 3-8 μm de largo. La superficie de las colonias es de 3 mm de ancho, compacto, liso, como se muestra en la figura 2. El crecimiento en caldo da como resultado una turbidez espesa. Su temperatura óptima de crecimiento es de alrededor de 30-35 °C.

Aislado de productos lácteos y ambientes como: las plantas de fermentación, conservas vegetales, productos de tomate echado a perder, masas fermentadas, estiércol de vaca y de la boca humana, el tracto intestinal y las heces (Buchanan y Gibbons, 1974).

Kedia y colaboradores en el 2008, aislaron del intestino humano el *L. plantarum* (NCIMB 8826), almacenaron y proliferaron la cepa en caldo MRS, hicieron recuento de células viables en placa a temperatura de 37 ° C.

La cepa fue utilizada para fermentar harina de avena, junto con la harina blanca y de salvado, con el fin de comparar cual es el mejor sustrato para la producción de una bebida probiótica. Los tres sustratos muestran una concentración de células viables al final de la fermentación por encima del mínimo requerido en un producto probiótico. Concluyendo que la mayor concentración de células se observó en la harina blanca y la más baja en la muestra de salvado.

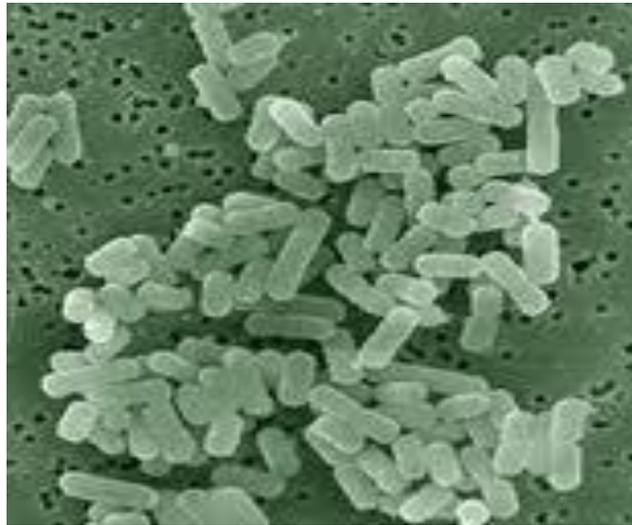


Figura 2. *Lactobacillus plantarum*

4.1.3 *Lactobacillus sanfranciscensis*

Es una bacteria de forma bacilar, heterofermentativos obligatorios, mide de 0.6-0.8 por 2-4 μm , se encuentra solo y en pares, no crece a más de 45 °C pero sí a 15 °C (Sneath y col., 1986) ver figura 3. Es una especie autóctona aislada exclusivamente de las masas agrias, generalmente es considerada la bacteria láctica más importante en la fermentación de las masas de trigo y centeno, predomina por encima de otros lactobacilos heterofermentativos y homofermentativos (De Angelis y col., 2007).

Thiele y colaboradores en 2004, determinaron la hidrólisis y depolimerización de las proteínas del gluten, usando una masa control, una acidificada y con adición de BAL (*L. sanfranciscensis* y *L. points*). La masa fue caracterizada con respecto a conteo de células, pH, concentración de nitrógeno amino primario y la distribución de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS), de acuerdo a su solubilidad. A partir de ello se concluyó que la hidrólisis y despolimerización de las proteínas es causada principalmente por la activación de las enzimas (proteinasas

y peptidasas) mismas que se activan con la disminución del pH, siendo las masas inoculadas con *L. sanfranciscensis* y *L. poins* quienes tuvieron el menor valor de pH (3.62-3.60) respectivamente de todos los tratamientos.



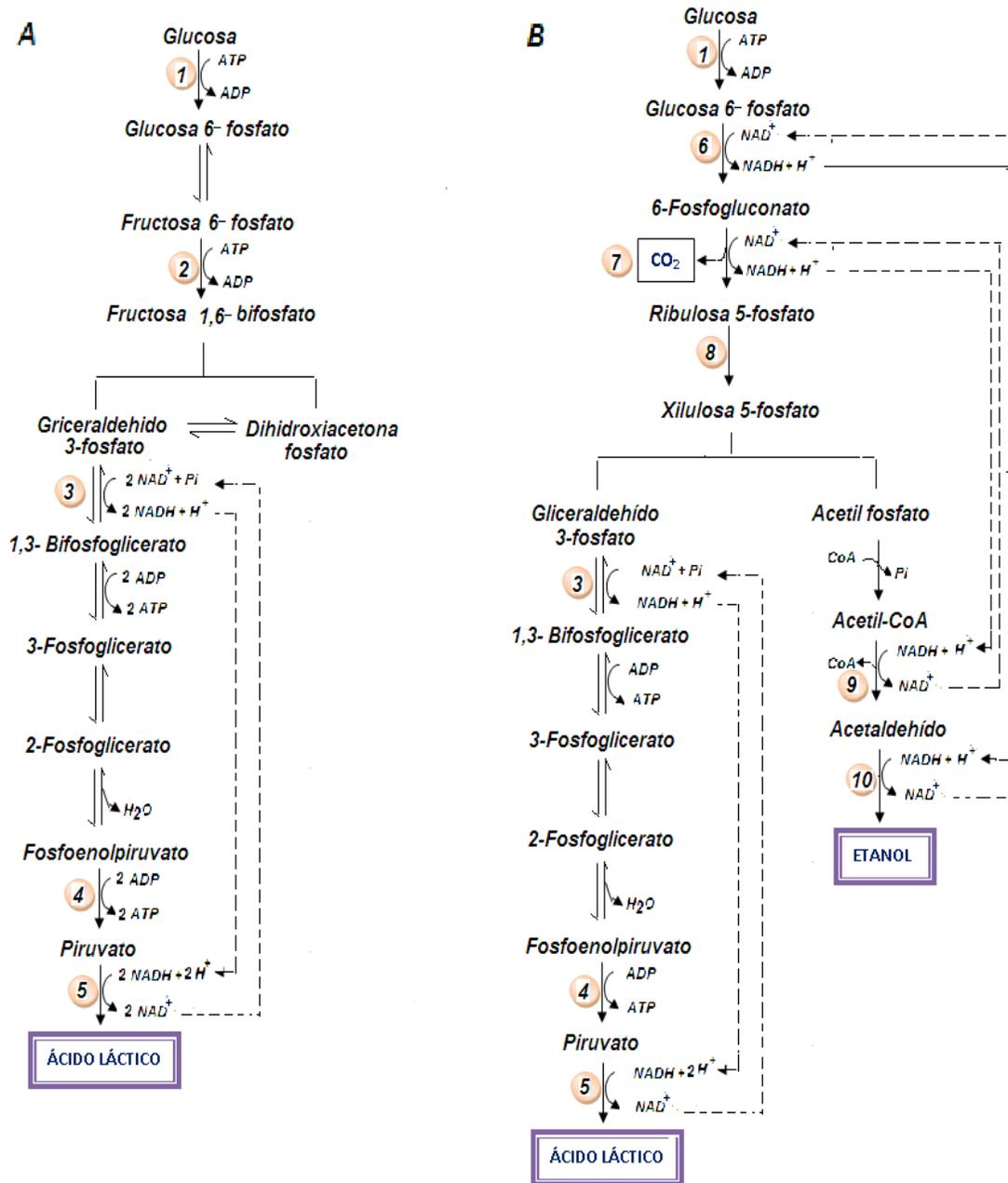
Figura 3. *Lactobacillus sanfranciscensis*

4.2 Rutas metabólicas de las bacterias ácido-lácticas

Las rutas metabólicas de las BAL se muestran en la figura 4, el inciso A corresponde a las BAL homofermentativas que siguen la ruta de la glucólisis (Embden-Meyerhof), que se caracteriza por la formación de fructuosa-1,6-difosfato; que en condiciones normales con un exceso de azúcar y un acceso limitado de oxígeno, el piruvato es reducido a ácido láctico. El inciso B corresponde a las BAL heterofermentativas donde la fase inicial es la glucosa-6-fosfato, por la vía de las pentosas-fosfato, que inicia con una deshidrogenación formando el 6-fosfogluconato, seguido por descarboxilación, los restantes pentosa-5-fosfato siguen la ruta de la glucólisis para formar ácido láctico, si no hay electrones receptores adicionales está disponible el acetaldehído para formar

etanol, existe la formación de otros productos como CO_2 y ácido acético (Salminen, 1993).

Figura 4. Rutas metabólicas de las bacterias ácido-lácticas



Fermentación de masas por bacterias ácido-lácticas con actividad proteolítica, para la elaboración de pan blanco

4.3 Masas fermentadas

4.3.1 Definición

Las masas fermentadas se definen como las masas cuyos microorganismos, principalmente BAL y levadura, se originan de masa madre y son metabólicamente activas o reactivadas (Di Cagno y col., 2002; Corsetti y Settanni., 2007). La masa fermentada es caracterizada por la presencia de levadura y BAL, que ambas desempeñan funciones vitales en los sistemas de trigo (Simonson y col., 2003).

4.3.2 Beneficios obtenidos por la adición de bacterias ácido-lácticas en los alimentos

Los lactobacilos son organismos que mejoran la calidad y los aspectos nutricionales y saludables de las masas fermentadas. Los granos de cereales son una fuente de minerales tales como: potasio, magnesio, zinc y hierro, pero también contienen ácido fítico, que es un compuesto cargado por seis aniones, que forma un complejo quelante con los minerales. En las masas agrias hay condiciones de pH bajos debido a la producción de ácidos orgánicos por las BAL, el pH bajo activa las fitasas impidiendo la formación del complejo ácido fítico-mineral y así permitiendo la biodisponibilidad de los minerales. Con la elaboración de pan a partir de masas fermentadas, obtenemos panes con un bajo contenido de fosfatos de inositol, lo que muestra beneficios saludables en la protección de arterias coronarias, arterosclerosis y enfermedades del tejido neural (Corsetti y Settanni, 2007).

Liljeberg y colaboradores en el 1995, realizaron un estudio para evaluar la posible influencia de los ácidos que se forman durante la fermentación de la masa para la elaboración de pan. El ácido láctico fue generado por un iniciador

homofermentativo el cual fue inoculado a la masa, también se trabajó con propionato de sodio, los productos fueron evaluados con respecto a la saciedad.

Los resultados de este estudio indican que el consumo de productos de panadería que contienen ácido láctico, ya sea generado durante la fermentación o añadido, reduce el nivel de glucosa en la sangre y la respuesta de insulina, lo que se traduce en un alimento con bajo índice glicémico (IG), lo que puede ser una alternativa para personas con problemas de diabetes.

4.4 Trigo

4.4.1 Historia del trigo en México

Según relato de los historiadores Andrés de Tapia y Francisco López de Gómora, el negro portugués Juan Garrido, criado de Hernán Cortés, fue el primero en sembrar y cosechar el trigo en México al encontrar mezclados tres granos en un costal de arroz. Sólo germinó uno que dio 180 granos y de esa espiga se hicieron otras siembras que comenzaron a cultivarse en diferentes regiones de la Nueva España.

Ya para 1534, a escasos 13 años de consolidar la conquista, se levantaban importantes cosechas de trigo en las inmediaciones de Texcoco y Puebla.

El cultivo del trigo en la Nueva España, así como su transformación en harina y posteriormente en pan, fue una necesidad imperiosa de los conquistadores, para satisfacer aquí viejas costumbres en su alimentación. También tuvieron la tarea de enseñar a los autóctonos la molienda y la elaboración del pan convirtiéndose en parte de la dieta americana desde entonces (harina.org).

4.4.2 Producción de trigo en México

Los principales estados productores de trigo en México son Sonora (48%), Baja California (14%) y Guanajuato (12%). Teniendo una producción total de 3, 509,241 ton.



Figura 5. Estadísticas de los principales estados de la República Mexicana productores de Trigo (SAGARPA. 2007)

4.4.3 Composición y valor nutricional

En la figura 6 se muestra un grano de trigo que consta de pericarpio y semilla que a su vez se subdividen en cubierta de semillas, endospermo y germen. El porcentaje de proporción media para los componentes del trigo son los siguientes: endospermo con 82.4 % está compuesto de almidón y proteínas, la testa más el pericarpio están en un 8.2 % y están compuestos de fibra insoluble (xilanos, celulosa y lignina) y ácidos fenólicos y el germen con un 2.8 % contiene los lípidos, antioxidantes, vitaminas del grupo B y E, minerales, fitosteroles y enzimas.

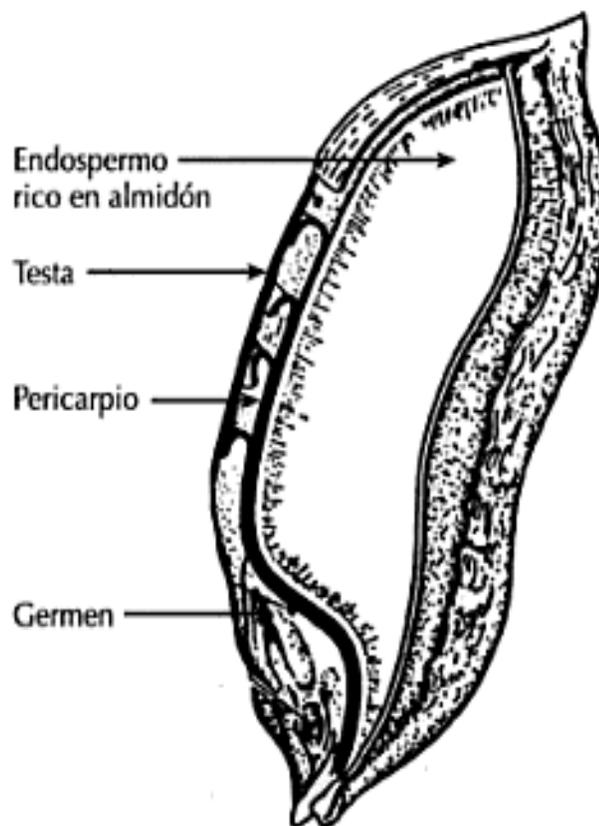


Figura 6. Componentes del grano de trigo

En la tabla 2 se observa que de acuerdo a la composición química el trigo tiene el mayor contenido de proteínas, seguido de la avena y la cebada. El trigo es uno de los principales cereales de la dieta de gran parte de la población mundial (Villanova y Guerra, 2010).

Tabla 2. Composición química aproximada de los granos de cereales (g/100 g de porción comestible)

Cereal	Humedad	Glúcidos	Proteínas	Lípidos	Sustancias minerales	Fibra dietética
Trigo	14,0	56,9	12,7	2,2	1,6	12,6
Arroz	11,8	74,3	6,4	2,4	1,6	3,5
Avena	8,9	60,1	12,4	6,4	1,9	10,3
Centeno	15,0	58,9	8,2	1,5	1,8	14,6
Cebada	11,7	56,1	10,6	1,6	2,7	17,3
Sorgo	14,0	59,3	8,3	3,1	1,5	13,8
Mijo	13,3	66,3	5,8	4,6	1,5	8,5

Fuente: FOA 1990

Existen tres especies comunes de trigo, dos son trigos comunes (*Triticum aestivum*) y club (*Triticum compactum*) se utilizan para fabricar harinas y el tercero, el trigo duro, se utiliza para hacer productos de pasta secas (Charley, 2009).

Para propósitos de la comercialización, el trigo se clasifica con base en características que afectan su uso en la manufactura de diversos alimentos procesados. En ocasiones el trigo se comercializa tomando en cuenta, además de otros factores, su contenido de proteína. El contenido de proteína es de primordial importancia, ya que la proteína en su mayoría (80-85 %) forma el complejo conocido como gluten y es el factor principal que determina la calidad del trigo.

Una posible clasificación, basada en las características de la textura del endospermo y la fuerza del gluten (Kohli y Martino., 1998) se presenta en la tabla 3.

Fermentación de masas por bacterias ácido-lácticas con actividad proteolítica, para la elaboración de pan blanco

Tabla 3. Composición nutricional del trigo y sus componentes

	Trigo integral	Endospermo (83 %)	Salvado (14.5 %)	Germen (2.5 %)
		(g/100 g)		
Humedad	12	12	12	10
Carbohidratos	69	76	44	46
Proteínas	12	10	15	28
Grasas	2	1	5	9
Cenizas	2	0.5	10	5
Fibra cruda	3	0.5	14	2
		($\mu\text{m}/100\text{ g}$)		
Tiamina	350	200	810	2000
Riboflavina	160	70	620	700
Niacina	5400	1100	27500	4500
Piridoxina	500	200	1800	3000
Ácido pantoténico	1300	750	4500	1000
Ácido fólico	36	15	65	500
Biotina	10	4	45	17
Caroteno	5	-	-	200
Tocofenol	500	-	-	2700
		(mg/100 g)		
Calcio	45	18	200	70
Hierro	4	1	20	8
Fósforo	430	126	2100	1100
Magnesio	180	28	680	270
Potasio	450	105	210	840

Fuente: FAO 1990

Para poder identificar cuál es el uso más apropiado de una variedad o un lote de trigo, es recomendable establecer un sistema que permita su clasificación en grupos generales de calidad que indiquen su uso en la producción de pan, galletas, repostería y pastas alimenticias, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Clasificación del trigo con base en sus características generales de calidad y uso industrial

Grupo	Fuerza de gluten	Uso industrial	Endospermo
1	Fuerte/extensible	Panificación mecanizada	Duro a semi-duro
2	Medio/extensible	Panificación manual	Duro a semi-duro
3	Débil/extensible	Elaboración de galletas y repostería, panificación artesanal	Suave (blando)
4	Medio/tenaz (poco extensible)	Algunos productos de repostería	Duro a semi-duro No panificable
5	Fuerte/tenaz	Elaboración de pastas alimenticias (espagueti, etc.)	Muy duro y cristalino No panificable

Fuente: Kohli y Martino, 1998

4.4.4 Harina de trigo comercial

El trigo apropiado para la harina se puede clasificar de acuerdo al color de la superficie de la semilla (blanca o roja), la estación en que se planta (invierno o primavera) y si es dura o suave. El trigo rojo suave se siembra en el otoño, por lo que también se le conoce como trigo de invierno. El trigo rojo duro se planta en primavera o en otoño dependiendo de las condiciones de crecimiento en el área (Charley, 2009).

La harina de trigo es el principal ingrediente para la elaboración de productos horneados. Sus componentes son: almidón (70 - 75 %), agua (14 %) y proteínas (10 - 12 %), además de polisacáridos del almidón (2 - 3 %) particularmente arabinosas, xilanos y lípidos (2%).

De acuerdo al grado de extracción del grano de trigo, se puede observar la composición química de la harina de trigo en la tabla 5.

Tabla 5. Composición química de la harina de trigo con diferentes grados de extracción (% de extracto seco)

	Grado de extracción (%)						
	100	95	91	87	80	75	66
Cenizas	1,8	1,5	1,3	1,0	0,7	0,6	0,5
Proteínas*	14,2	13,9	13,8	13,4	13,4	13,5	12,7
Lípidos	2,7	2,4	2,3	2,0	1,6	1,4	1,1
Almidón y azúcares	69,9	73,2	75,3	77,2	80,8	82,9	84,0
Fibra cruda	2,4	2,1	1,5	1,1	0,2	0,3	0,2
Fibra dietética	12,1	9,4	7,9	5,5	3,0	2,8	2,8

*Proteínas = N x 5.7

Fuente: Villanova y Guerra, 2010

4.4.5 Proteínas de la harina de trigo

En la tabla 6 se muestran las proteínas de la harina de trigo que pueden clasificarse de acuerdo a su solubilidad y funcionalidad. La primera clasificación de las proteínas del trigo, fue presentada por Osborne en 1924, donde se realizó una serie de extracciones consecutivas con: agua, solución de sal diluida, solución de alcohol y solución de ácido o álcalis, de acuerdo a esta secuencia de separación, se clasificó a las proteínas en: albúminas, globulinas, gliadinas y gluteninas.

Tabla 6. Proteínas presentes en las fracciones de Osborne

Fracción Osborne	Comportamiento en Solubilidad	Composición	Papel biológico
Albúminas	Extraíbles en agua	No del gluten (monoméricas)	Estructurales y metabólicas
Globulinas	Extraíbles en sales diluidas	No del gluten (monoméricas)	Estructurales y metabólicas
Gliadinas	Extraíbles en soluciones de alcohol	Gluten (principalmente gliadinas monoméricas y polímeros de glutenina de bajo peso molecular)	almacenamiento de la semilla tipo prolaminas
Gluteninas	Extraíbles en ácido acético diluido	Gluten (principalmente polímeros de glutenina de alto peso molecular)	almacenamiento de la semilla tipo prolaminas
Residuo	Sin extraer	Proteínas del gluten (polímeros de alto peso molecular) y proteínas no del gluten poliméricas (triticinas)	Almacenamiento de la semilla, tipo prolamina (gluten) y tipo globulinas (triticinas)

Fuente: Osborne 1924

A partir de la funcionalidad de las proteínas, teniendo como base el trabajo de Goesaert y colaboradores en el 2005, podemos distinguir dos grupos que pertenecen a las proteínas del gluten: gliadinas, que son monoméricas y gluteninas que son poliméricas y estas últimas se subdividen en extraíbles y no extraíbles, tabla 7.

Tabla 7. Clasificación de las proteínas del trigo de acuerdo a su funcionalidad

Clasificación de acuerdo a su funcionalidad	Ubicación en el grano	% en la harina de trigo	Proteínas monoméricas	Proteínas poliméricas
Proteínas no pertenecientes al gluten	Principalmente en las capas externas del grano de trigo, y muy bajas concentraciones en el endospermo	15 – 20 %	Albúminas Globulinas	Triticinas
Proteínas pertenecientes al gluten	En el endospermo del grano de trigo	80 – 85 %	Gliadinas Gluteninas	Prolaminas

Fuente: Goesaert y col., 2005

5 Materiales y Métodos

5.1 Materias primas

Para el presente trabajo se utilizaron bacterias ácido-lácticas *L. brevis* CDBB-B-380 y *L. plantarum* CDBB-B1091, que fueron proporcionadas por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, y *L. sanfranciscensis* fue aislada del pulque, una bebida tradicional mexicana, y proporcionada por la Universidad Iberoamericana. La harina de trigo marca hoja de plata fue comprada en los Molinos Elizondo, México D.F.

5.2 Crecimiento de bacterias ácido lácticas (*L. brevis*, *L. plantarum*, *L. sanfranciscensis*)

- a) Las cepas fueron propagadas dos veces en caldo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS broth medium, Difco laboratorios, Inc., EUS), por 12 horas a 36 °C.
- b) Se tomaron alícuotas de 3.5 ml cada dos horas y se determinó el pH con un potenciómetro H1 223 (Hanna Instruments, Romania).
- c) Se tomaron lecturas de absorbancia a 620 nm con un espectrofotómetro Genesys 10 series (Thermo Scientific madison, WI 53711 USA). Finalmente se graficó el tiempo vs D.O.

5.2.1 Curva de crecimiento por conteo en placa

- a) Las cepas fueron propagadas dos veces en caldo MRS por 12 horas a 36 °C.
- b) Se tomaron alícuotas de 500 µl cada dos horas y se hicieron diluciones secuenciales (10^{-1} a 10^{-7}), en tubos conteniendo una solución de NaCl al 0.85%.
- c) De cada dilución se inocularon 100 µl, en la superficie de cajas petri conteniendo Agar MRS estéril.
- d) El inóculo se distribuyó en toda la superficie con una varilla de vidrio.
- e) Las cajas fueron incubadas a 36 °C durante 48 horas.
- f) Se contaron las colonias y se reportó como UFC/ml, para cada tiempo.
- g) Las UFC/ml se graficaron con respecto al tiempo.

5.2.2 Cultivo de células para inocular las masas

Las cepas de *L. brevis*, *L. plantarum* y *L. sanfranciscensis* fueron propagadas dos veces en caldo MRS por 12 h a 36 °C, el crecimiento se llevo a cabo en un tiempo de 8 h. las células fueron cosechadas por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C y lavadas dos veces y resuspendidas en una solución de NaCl al 0.85%. Para obtener una concentración final de 10^9 UFC/ml con las cuales se inocularon las masas para la fermentación (Kedia y col., 2008).

5.2.3 Determinaciones fisicoquímicas a la harina de trigo

El contenido de humedad se determinó por pérdida de peso en una muestra de 2 g, secando a 130 ± 3 °C durante dos horas (Camacho y col., 2004).

El porcentaje de cenizas se determinó en una muestra de 2 g, que se calcinó con mechero y posteriormente se incineró en mufla a 600 °C (AOAC, 1980).

5.2.4 Determinación de proteína total por el método de Kjeldahl

En base al método AOAC 920.87 se realizó la determinación de proteína. Se peso 1 g de muestra posteriormente se agregó al matraz Kjeldahl junto con 10 g de mezcla digestora, mas 10 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado al 98%, el extractor de humo modelo (BÜCHI 412) y el digestor modelo (BÜCHI 426) de calentamiento fueron conectadas a la corriente. Después de 45 min de digestión, el líquido tomo un color verde cuando ya no hubo desprendimiento de gases los tubos se pasaron al equipo de destilación modelo (BÜCHI 323). En el tubo terminal del destilador del equipo se colocó un matraz Erlenmeyer con 60 ml de ácido bórico (H_3BO_3) al 2%. Se añadieron automáticamente al tubo Kjeldahl conteniendo la muestra digerida, 80 ml de hidróxido de sodio al 32% y 50 ml de agua, destilándose aproximadamente 150 ml, el tiempo de destilación fue de 4 min. El producto de la destilación fue titulado con ácido clorhídrico (HCl) al 0.1 N, se colocaron 3 gotas de indicador Mortimer, el vire fue de verde a rosa.

Cálculos.

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{V \times N \times \text{meq}}{m} \times 100$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ de Nitrógeno} \times \text{factor}$$

Donde:

V = Mililitros gastados HCl en la titulación

N = Normalidad de la solución valoradas de HCl

m = Peso de la muestra en g

meq = miliequivalentes de nitrógeno, 0.014 g

El contenido de nitrógeno en diferentes proteínas es aproximadamente de 16%, se multiplica el % de Nitrógeno obtenido por el factor 5.7, para obtener la cantidad de proteína presente en el alimento. Factor de conversión para el trigo = 5.7

5.3 Formulación y Fermentación de las masas

Se utilizó harina comercial para panificación (humedad de 14.68%, proteína 11.53% y cenizas 0.625%). Las masas se prepararon mezclando agua y harina con una espátula estéril durante 3 minutos, adicionando el inóculo de tal manera de tener 10^9 UFC/ ml (ver figura 13), adicionalmente se prepararon el control y una masa a la que se adicionó ácido láctico (3.4% v/v), obteniendo un rendimiento de masa (DY) de 166.

El DY es una relación (peso de la harina + agua / peso de la harina) * 100 (Clarke y col, 2004). La formulación de la masa se muestra en la tabla 8.

Las fermentaciones se llevaron a cabo durante 24 horas a 28 °C, se tomaron muestras al inicio y a las 24 horas de fermentación, para los análisis subsecuentes.

Tabla 8. Formulación de las masas

	Control (g)	Masa con ácido láctico (g)	Masa con BAL (g)
Harina de trigo	25	25	25
Agua	16.5	_____	_____
Solución de ácido láctico pH 3.8	_____	16.5	_____
Solución de BAL	_____	_____	16.5

5.3.1 Conteo de células viables en las masas

Se determinó el número de células viables de las BAL (UFC/g de masa), mediante la técnica de recuento en placa de la siguiente manera:

- a) Se pesó 0.5 g de cada masa fermentada para el (t=0 y t=24), se mezcló con 4.5 ml de agua estéril. Agitar en el vortex hasta obtener una dispersión homogénea.
- b) Bajo condiciones asépticas, se tomaron 500 μ L y se depositaron en los tubos conteniendo una solución de NaCl al 0.85%, se hicieron diluciones secuenciales (10^{-1} – 10^{-7}).

- c) De cada dilución se inocularon 100 μ L, en la superficie de cajas petri conteniendo Agar MRS estéril.
- d) El inóculo se distribuyó en toda la superficie con una varilla de vidrio.
- e) Las cajas fueron incubadas a 36 ° C por 48 horas.
- f) Se contaron las colonias y se reportó como UFC/g de masa.

5.4 Estudios de grado de proteólisis en las masas fermentadas

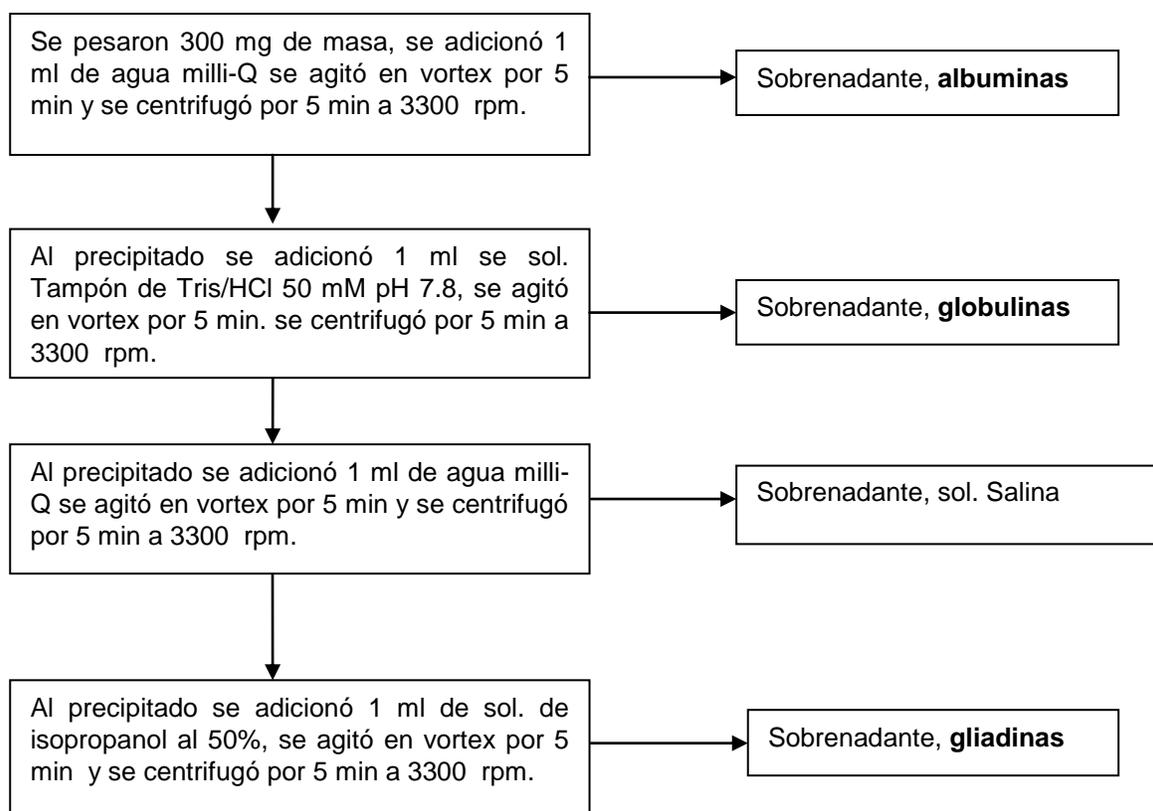
5.4.1 Determinación de pH y acidez titulable ATT

La determinación del pH se realizó con un potenciómetro (H1 223 Hanna Instruments, Romania). Se pesó 1 g de masa y se adicionó a 9 ml de agua destilada, se agitó en el vortex durante 5 minutos y se procedió a tomar la lectura (Thiele y col., 2004).

La acidez titulable ATT se determinó por titulación con NaOH a 0.1 N, hasta pH de 8.5. La acidez se expresó en % de ácido láctico (López y col., 2001).

5.4.2 Extracción de las fracciones proteicas para las determinaciones de Nitrógeno Amino Primario y electroforesis

En el siguiente diagrama se muestra la secuencia, para obtener las fracciones proteicas del gluten de la masa de trigo, de acuerdo con la metodología de Colombo y colaboradores en el 2008, donde las fracciones son extraídas de acuerdo a su solubilidad.



Los sobrenadantes de albumina, globulina y gliadina fueron filtrados a través de un filtro de membrana de celulosa con tamaño de poro de 0,45 μm .

Figura 7. Diagrama de extracción de las fracciones proteicas de la masa de trigo.

5.4.3 Determinación de Nitrógeno Amino Primario por TNBS

La concentración de aminoácidos libres fue determinada a las fracciones proteicas de la masa (albúminas, globulinas y gliadinas), de acuerdo al método del ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS), utilizado por Zotta y colaboradores en el 2006. Una curva de calibración fue realizada usando L-leucina como estándar (rango = 0.0–7.0 mg/L de L-leucina) ver apéndice, figura 19. En tubos ámbar con rosca se

adicionó 1.0 ml de buffer fosfato pH 8.2 y 63 µl de las fracciones proteicas, se mezcló y adicionó 0.5 ml de TNBS al 0.1 %, se mezcló inmediatamente en vortex. Se colocaron los tubos en un baño maría a 50 ° C durante 30 minutos en completa obscuridad. Transcurrido el tiempo, se adicionó 2.0 ml de sulfito de sodio 0.1 N para detener la reacción. Se dejó reposar 15 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 420 nm. Los resultados fueron expresados como mg de L-leucina/kg de masa.

5.4.4 Técnica de separación de péptidos: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS)

Existen varios métodos para analizar las fracciones proteicas, para este caso se utilizó PAGE-SDS usando un Bio-Rad Mini-Prontean 3 cell (Bio-Rad, Laboratories, CA), una cámara electroforética vertical, usando el sistema buffer de Laemmli de 1970. Los extractos de las masas fueron mezclados con 2 volúmenes de buffer de muestra y calentados a 95 °C durante 5 minutos, en presencia de 5 % de mercaptoetanol.

La electroforesis fue llevada a cabo en un gel de separación (12% w/v T, 2.67% w/v C) y gel compactador (4% w/v T, 2.67% w/v C). Los geles fueron corridos a 120 volts durante 2 horas, usando una fuente de poder de 300 unidades y teñidos con un kit de tinción Silver Stain Plus, Bio-Rad Laboratories, CA.

Para estimar los pesos moleculares de las bandas presentes en los geles, se realizó una curva estándar, tomando de referencia los PMs estándares, ver apéndice figura 20.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

5.5 Elaboración de pan blanco

Los ingredientes para la elaboración del pan blanco se muestran en la tabla 9. Se rehidrata la levadura con 10 ml de leche de la formulación llevada a 25 °C y se deja reposar 15 minutos. La harina se mezcló con la levadura rehidratada, los demás ingredientes de panificación para formar una masa homogénea y tersa. La masa se colocó en la cámara de fermentación a 30 °C y humedad controlada de 85 %, durante dos horas (Serna, 2003).

La masa se saca de la cámara y se amasa para distribuir uniformemente el gas. Se rola y se pesan dos porciones iguales, que se colocan en moldes de 7 X 12 cm, previamente engrasados. Es importante pesar la masa para que las hogazas sean iguales y se puedan comparar. Se realiza la fermentación secundaria durante 60 minutos. Finalmente, la masa se hornea a 200 °C durante 20 a 25 minutos.

El pan se deja en enfriar, se desmolda y se empaca para las evaluaciones.

Tabla 9. Formulación de pan blanco

Ingredientes	Masa Fermentada	Refresco
Harina de trigo	70 g	30 g
Leche	42 ml	24 ml
Levadura	----	1.2 g
Sal	----	1 g
Azúcar	----	8 g
Mantequilla	----	10 g

5.5.1 Determinación de volumen específico

Para determinar el volumen específico de los panes elaborados, primero se tomó el peso y volumen de los panes. El peso se tomó con una balanza modelo (HH 320 OHAUS Corporation, USA) y el volumen se realizó por el método de desplazamiento de semilla de mostaza, con un medidor de volumen (Volunómetro National MFGCO, Lincoln Neber) figura 8, se realizaron los cálculos correspondientes para obtener el volumen específico, (Alvarez y col., 2010).

$$\text{Volumen específico, (cm}^3\text{/g)} = \frac{\text{Volumen del pan}}{\text{Peso del pan}}$$



Figura 8. Volunómetro National MFGCO

5.5.2 Análisis de Perfil de Textura en pan blanco

La textura del pan blanco se determinó con un Texturómetro modelo TAXT-PLUS (Texture Analyser, USA/ Stable Micro Systems) figura 9, equipado con una carga de 25 Kg de peso y una sonda de acrílico de 36 mm de diámetro, el pan fue previamente rebanado utilizando una rebanadora profesional modelo CP4400AP (Machines Coplain, France) para poder hacer el análisis figura 10. El procedimiento de este estudio consiste en tomar una pieza del tamaño de un bocado de comida,

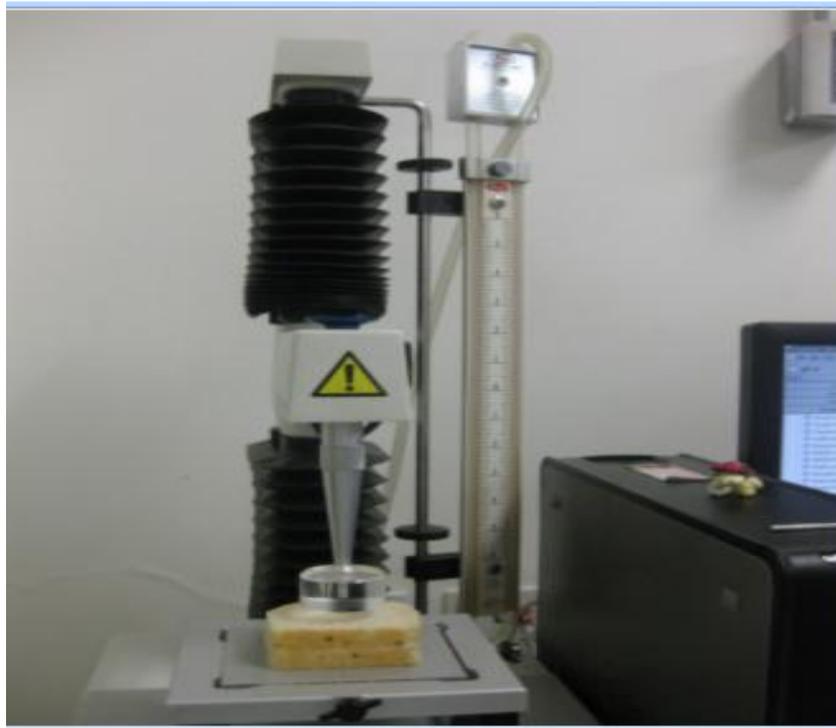


Figura 9. Texturómetro TAXT-PLUS

para ser comprimida dos veces en un movimiento alternativo, resultando una curva típica de análisis de perfil de textura de fuerza-tiempo, figura 11 de la cual

obtenemos los parámetros de textura que se correlacionan con la evaluación sensorial (Bourne, 1978).



Figura 10. Rebanadora profesional de pan

La prueba se realizó con los siguientes parámetros: velocidad antes de la prueba, velocidad de prueba y velocidad después de la prueba de 2, 1.7 y 10.0 mm/sec, dos compresiones de 10.00 mm de separación con un tiempo de 6.2 sec. Todos los panes fueron analizados después de 24 horas de elaborados.

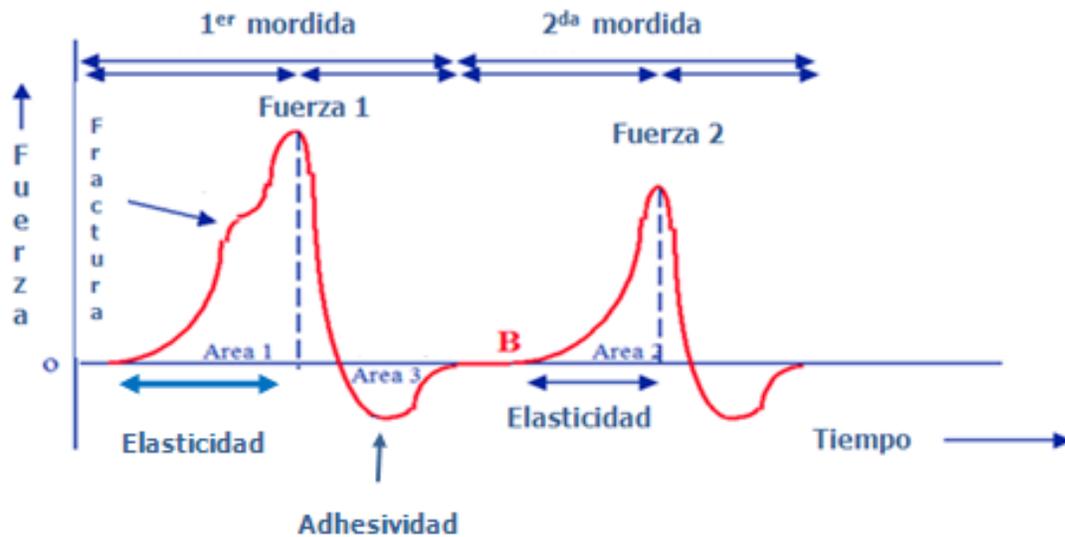


Figura 11. Curva Típica de Análisis de Perfil de Textura

De la curva se obtienen los siguientes parámetros primarios:

- Dureza se define como la fuerza máxima durante el primer ciclo de compresión.
- Elasticidad o esponjosidad está relacionada con la altura que el alimento recobra en un lapso de tiempo y es la relación de la distancia 2 entre la distancia 1 (d_2/d_1).
- Cohesividad se define como la relación de áreas entre el segundo ciclo de compresión y el primer ciclo (A_2/A_1).
- Adhesividad es el área negativa que resulta de la primera mordida, representa el trabajo necesario cuando la sonda se quita de la muestra.

Parámetros secundarios:

- Gomosidad se define como el producto de la fuerza * cohesividad.
- Masticabilidad se define como el producto de la gomosidad * elasticidad.
- Resilencia es una medida de cuanto se recupera la muestra cuando fue deformada, es la propiedad de un material para regresar a su forma original después de ser estirado, doblado o apretado, sometido bajo una fuerza. Con el fin de obtener un valor significativo de este parámetro se debe optar por una prueba de velocidad relativamente lenta para permitir que la muestra pueda recuperarse, si es que la muestra posee esta propiedad.

5.5.3 Color en pan

El método para analizar el color de la superficie de los alimentos es sencillo, para analizar el color en los panes, se utilizó una cámara digital de alta resolución, (10.0 mega-píxeles), en condiciones de iluminación adecuada. Una computadora y un programa gráfico (Photoshop CS2, versión 9.0 Tiyout).

La imagen capturada por la cámara es un mapa de bits que consta de muchos píxeles, a cada píxel se le asigna un lugar específico y un valor de color. Al analizar la imagen con el Photoshop obtenemos valores de L, a y b que se utilizan comúnmente en los colores de medición en la investigación alimenticia. Donde L, a y b son estandarizados a L*, a* y b* estándares internacional adoptados por la comisión Internacional Eclairage d´(CIE) en 1976 (Yam y Papadakis, 2004).

Se toman varios puntos de la superficie (costra), con el promedio se estandarizan los valores de L, a, b con las siguientes ecuaciones:

$$L^* = (L / 255) * 100$$

$$a^* = (240 a / 255) - 120$$

$$b^* = (240 b / 255) - 120$$

5.5.4 Evaluaciones fisicoquímicas de humedad y cenizas

El contenido de humedad se determinó por pérdida de peso con una muestra de 2 g, secando previamente 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente llevado una estufa a 130 ± 3 °C durante dos horas (Camacho y col., 2004).

El porcentaje de cenizas se determinó en una muestra de 5 g, que se calcinó con mechero y posteriormente se incineró en mufla a 600 °C, de acuerdo al método (AOAC, 1980).

La determinación de proteína se realizó por el método (AOAC 920.87), descrito en la página 26.

5.5.5 Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados usando el programa estadístico Statgraphics Centurión XV ®, para desarrollar la prueba de comparación de medias mediante la técnica de diferencia mínima significativa (LSD, por sus siglas en inglés). Correspondientes en cada caso, para lo cual se utilizó un rango de confiabilidad de 95 %.

6 Resultados y Discusión

6.1 Curvas de crecimiento de las bacterias-ácido lácticas

Las curvas de crecimiento y la evaluación del pH se presentan en la Figura 12, donde se observa que la fase logarítmica de crecimiento tuvo lugar desde las 3 horas y hasta las 8 horas para todos los casos. Entre las 4 y 6 horas de crecimiento se alcanzó un valor de pH de 4.5 donde de acuerdo con León y colaboradores quienes en el 2006, reportan que es el valor adecuado para garantizar la liberación de ácidos, aromas, péptidos y exopolisacáridos que mejoran el sabor y la textura del pan. A partir de las curvas de crecimiento se determinó que el tiempo para cosechar las bacterias usadas para la fermentación de las masas agrias fue de 8 horas, teniendo una concentración de 2.8×10^9 UFC/ml, figura 13.

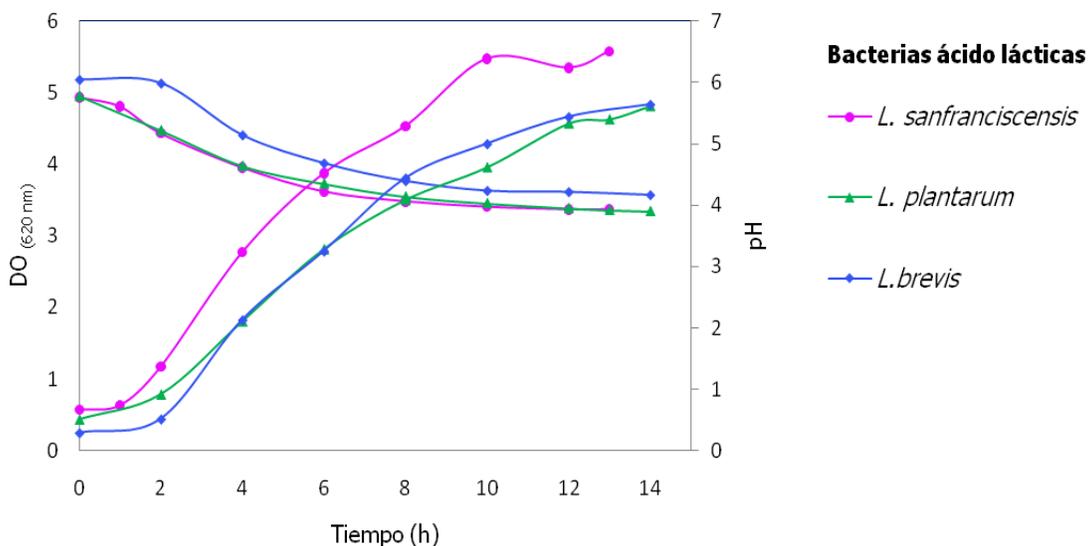


Figura 12. Curva de crecimiento de las bacterias ácido-lácticas y pH

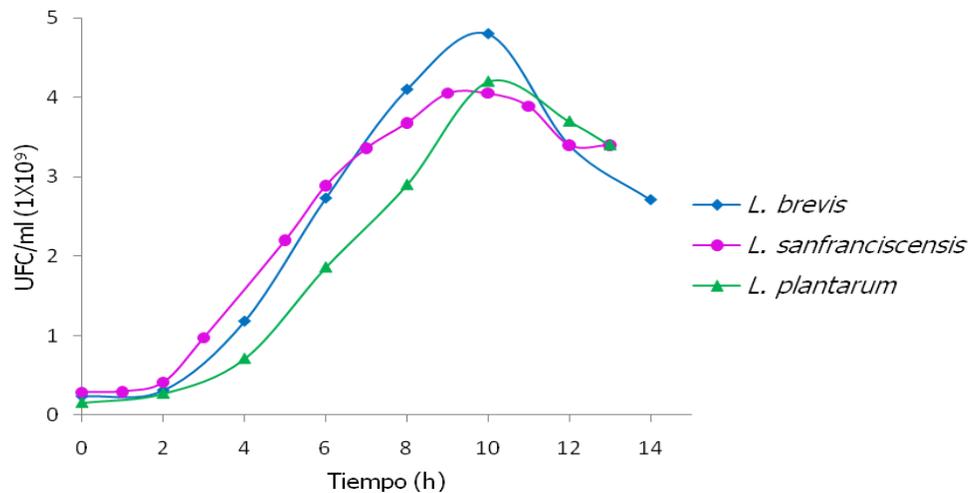


Figura 13. Curva de crecimiento de UFC/ml vs Tiempo

6.2 Estudios de grado de proteólisis en las masas fermentadas

6.2.1 Evaluación de la disminución de pH

En la tabla 10 se reportan los valores de pH de las masas fermentadas, la fermentación se llevo a cabo durante 24 horas, se elaboraron cinco tratamientos de los cuales, los resultados muestran que hay diferencia significativa entre el control con un pH de 4.8 y las masas, tanto las acidificadas químicamente con un pH de 3.7 como las adicionadas con *L. brevis* (3.2) , *L. plantarum* (3.2) y *L. sanfranciscensis* (3.3), es evidente que con la adición de BAL y el tiempo de fermentación hay una disminución de pH; lo que se atribuye a la actividad proteolítica de las mismas, debido a que durante el proceso de fermentación los azúcares del almidón son hidrolizados por la amilasas, resultando dos moléculas de glucosa (glucosa-1-P + glucosa), mismos que son convertidos en acido láctico y acido acético. Los resultados de este estudio están de acuerdo con Zotta y colaboradores (2007) y Clarke y colaboradores (2004), quienes reportaron valores de pH de 3.5 – 4.5. Resultados similares fueron reportados también por Thiele y

colaboradores (2004), quienes trabajaron con *L. sanfranciscensis* y *L. pontis* donde obtuvieron valores de pH de 3.62 a 3.60.

Tabla 10. Evaluación de la disminución de pH

Tratamientos	pH
	t=24
Control	4.8 ± 0.36 ^a
Ac. láctico	3.7 ± 0.53 ^b
<i>L. brevis</i>	3.2 ± 0.20 ^b
<i>L. plantarum</i>	3.2 ± 0.26 ^b
<i>L. sanfranciscensis</i>	3.3 ± 0.26 ^b
LSD	0.624

Letras iguales en la columna, no hay diferencia significativa entre los tratamientos, con valores mayores al LSD indicado ($p > 0.5$)

6.2.2 Evaluación del porcentaje de ácido láctico

En la tabla 11 se reportan los valores de porcentaje de ácido láctico obtenidos de las masas fermentadas después de 24 horas, la producción de ácido láctico en las masas adicionadas con BAL es significativamente mayor (1.35 % de ácido láctico) en comparación con el control y la masa acidificada químicamente (0.89 y 0.99 % respectivamente). Aquí se observan diferencias significativas entre los tratamientos, donde *L. sanfranciscensis* y *L. brevis*, muestran el mayor contenido de ácido láctico debidos a que son capaces de fermentar los carbohidratos solubles en la harina de trigo (maltosa, sacarosa, glucosa y fructosa), y son lactobacilos heterofermentativos (producción de ácido láctico y ácido acético), en cuanto a *L. plantarum* tiene un menor porcentaje de ácido láctico, debido a que es un *Lactobacilos* homofermentativo, (solo produce ácido láctico). Clarke y colaboradores en el 2004, trabajaron con masas fermentadas, para evaluar el

Fermentación de masas por bacterias ácido-lácticas con actividad proteolítica, para la elaboración de pan blanco

efecto del tiempo de fermentación sobre las masas, para esto, realizaron varias determinaciones entre ellas la ATT, reportando un incremento en la acidez debido a la producción de ácido láctico en las masas durante la fermentación, por lo que concluyen que el tiempo de fermentación es la clave para el proceso de degradación proteica, debido a que se necesita de 8 horas para alcanzar un pH se 4.0, con este valor de pH se favorece la activación de las enzimas que llevan a cabo la proteólisis.

Tabla 11. Evaluación del % de ácido láctico

Tratamientos	% de ácido láctico	
	t=0	t=24
Control	0.18	0.89 ± 0.04 ^d
Ac. láctico	0.2	0.99 ± 0.03 ^c
<i>L. brevis</i>	0.18	1.35 ± 0.04 ^a
<i>L. plantarum</i>	0.18	1.26 ± 0.05 ^b
<i>L. sanfranciscensis</i>	0.18	1.35 ± 0.03 ^a
LSD		0.066

Letras iguales en la columna, no hay diferencia significativa entre los tratamientos, con valores mayores al LSD indicado ($p > 0.5$)

6.2.3 Análisis de Nitrógeno Amino Primario

En la tabla 12 se muestran los resultados de NAP realizados a las masas fermentadas, donde se puede observar diferencia significativa entre todos los tratamientos. La mayor actividad proteolítica se observó en la masa inoculada con *L. sanfranciscensis* con (3467.74 mg de L-leucina/kg de masa), seguida de la masa inoculada con *L. brevis* con (2935.87 mg de L-leucina/kg de masa). Cabe destacar que el grado de proteólisis obtenido con la masa acidificada

Fermentación de masas por bacterias ácido-lácticas con actividad proteolítica, para la elaboración de pan blanco

químicamente (2608.87 NAP mg de L-leucina/kg de masa) fue significativamente superior a la masa inoculada con *L. plantarum* (2370.96 NAP mg de L-leucina/ kg de masa) lo que podría deberse a la activación de las enzimas proteolíticas de la harina en las fases tempranas de fermentación, al alcanzar rápidamente un pH menor a 4.5 requerido para dicha activación (Zotta y col., 2007). Mientras que para llegar a esos valores de pH por la producción de ácidos por las bacterias ácido lácticas, se requiere alrededor de 8 horas. Se observó también que la masa control tuvo un grado de proteólisis significativamente menor (1951.61 NAP mg de L-leucina/ kg de masa), en este caso, dado que no se trabajó con un sistema estéril, la hidrólisis alcanzada podría atribuirse a la microbiota presente en la harina, resultados similares de la concentración de Nitrógeno Amino Primario fueron reportados por Di Cagno y colaboradores en 2002. Donde evaluaron la actividad proteolítica de diferentes lactobacilos en masas fermentadas, determinando el incremento de la concentración de amino ácidos libres, donde reportaron valores de 2,002 mg/kg y 2,0213 mg/kg para *L. brevis* y *L. sanfranciscensis* respectivamente.

Tabla 12. Análisis de Nitrógeno Amino Primario

Tratamientos	NAP mg de L-leucina/kg de masa
Control	1951.61 ± 6 ^e
Ac. Láctico	2608.87 ± 6 ^c
<i>L. brevis</i>	2935.87 ± 12 ^b
<i>L. plantarum</i>	2370.97 ± 7 ^d
<i>L. sanfranciscensis</i>	3467.74 ± 8 ^a
LSD	14.03

Letras iguales en la columna, no hay diferencia significativa entre los tratamientos, con valores mayores al LSD indicado ($p > 0.5$)

6.2.4 Análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS)

En la figura 14 se muestran las fracciones (albúminas, globulinas y gliadinas) de las proteínas de trigo analizadas en el tiempo=0, donde las fracciones de albúminas, globulinas y gliadinas mostraron bandas de altas concentraciones con masa moleculares en un rango de 41 a 30 kDa. Se observa que en todos los casos, los tipos de bandas fueron similares a los de la masa control, indicando que aún no habían ocurrido cambios en las proteínas.

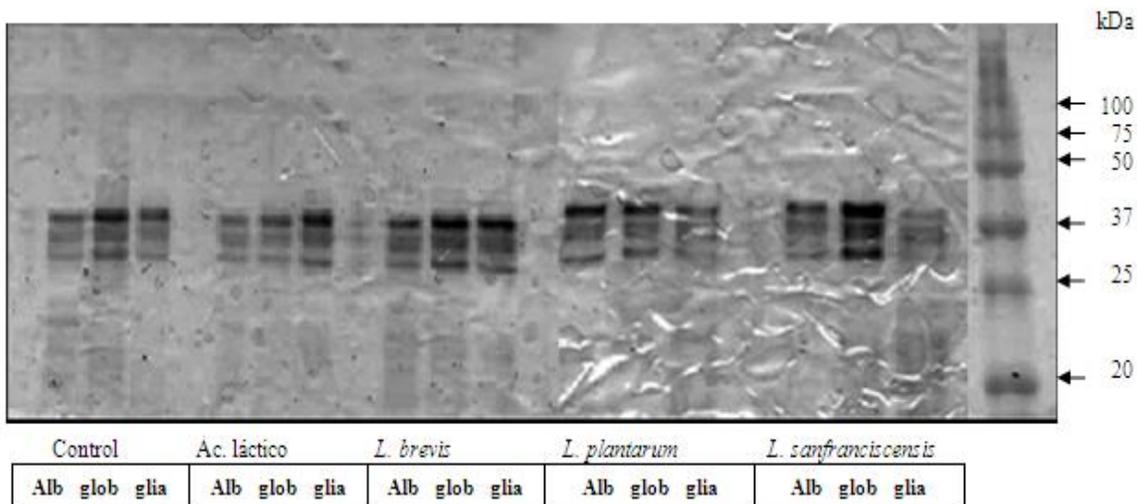


Figura 14. Fracciones proteicas de las masas en el t=0 de fermentación, analizadas en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS)

A las 24 horas de fermentación, se observaron diversos cambios en las fracciones proteínicas en relación con el tipo de microorganismo empleado y por la acidificación química (Figura 15). Las bandas obtenidas después de la fermentación de las masas agrias, indicaron que se produjo un rompimiento de las proteínas de masas moleculares altas, tal como ya fue reportado por Zotta y colaboradores en 2006.

La intensidad de esas bandas, disminuyó con el tiempo de fermentación y algunas bandas desaparecieron completamente debido a la actividad proteolítica. En los casos donde se inocularon las BAL la fracción de globulina, para *L. brevis* se muestran bandas de péptidos de PMs de (17-19-21-22-26-29-35-38-44) kDa, *L. sanfranciscensis* mostro péptidos de PMs de (14-15-19-21-32-35-38-40) kDa, con *L. plantarum* se observan bandas de (14-16-21-22-32-35-38-40) kDa, siendo el control y la masa acidificada químicamente quienes tuvieron un menor número de bandas, lo que corresponde con los datos obtenidos del NAP, evidenciando que las BAL tienen actividad proteolítica, ya que donde estuvieron presentes hubo un mayor rompimiento de las proteínas del trigo, generándose péptidos de pesos moleculares bajos y aminoácidos libres. Esto también ocurrió en la masa acidificada químicamente, lo que podría sugerir la actividad proteolítica correspondiente a la producida por el sistema enzimático presente de manera natural en la harina de trigo.

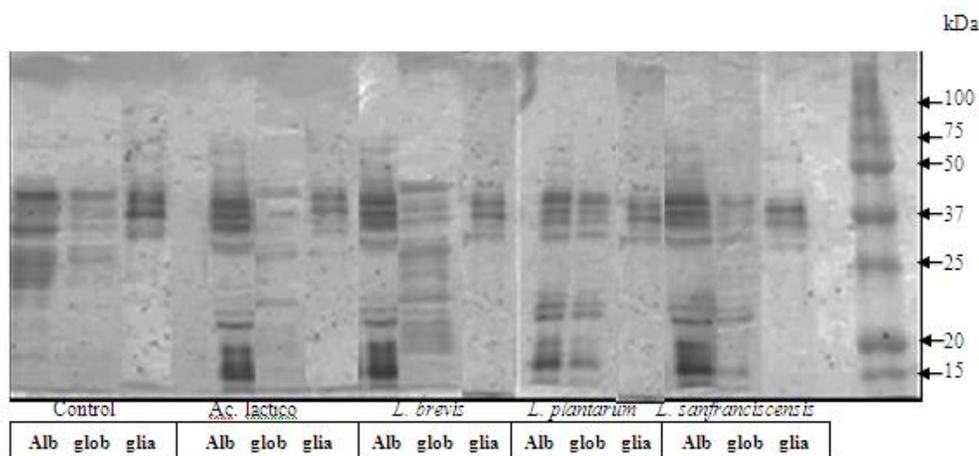


Figura 15. Fracciones proteicas de las masas después de 24 horas de fermentación analizadas en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)

Para las fracciones de albuminas, la mayor actividad proteolítica fue observada en las masas fermentadas con *L. brevis*, *L. sanfranciscensis*, lo cual concuerda con lo reportado por Di Cagno y colaboradores en 2002. En las masas fermentadas

con *L. plantarum* se observa una distribución de bandas, similar a la masa acidificada químicamente, en cuanto al control la distribución de bandas no es evidente, por lo que la actividad de las enzimas propias de la harina no es suficiente para tener una degradación de las proteínas del trigo y generar los péptidos y aminoácidos responsables del olor y sabor característico de productos fermentados.

6.3 Evaluaciones al pan blanco

6.3.1 Análisis de Perfil de Textura (APT) de los panes

6.3.1.1 Dureza

En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos del análisis de perfil de textura para los cinco panes elaborados. Aunque se observó una diferencia significativa entre los tratamientos, el pan control y el elaborado con la masa acidificada químicamente presentan una suavidad semejante.

Los panes elaborados con masa donde se adicionaron bacterias ácido-lácticas, presentaron diferencias significativas entre ellos, siendo menos suave el tratamiento adicionado con *L. sanfranciscensis*, seguido del tratamiento con *L. brevis* y por último el más suave *L. Plantarum* (1783.36, 1594.74 y 1318.67 g) respectivamente. Se busca tener un pan suave, por lo que podríamos considerar que el pan con *L. plantarum* es el mejor, aunque los panes con *L. brevis* y *L. plantarum* mostraron una aceptabilidad dentro de un grupo de personas de 10, donde mencionaron que el pan tenía una consistencia buena (estudio informal).

6.3.1.2 Elasticidad

Todos los tratamientos presentan una elasticidad significativamente diferente, el tratamiento adicionado con ácido láctico presentó una menor elasticidad, seguido del tratamiento con *L. plantarum*, siendo semejantes los tratamientos con *L. sanfranciscensis* y *L. brevis*, teniendo una elasticidad mayor el tratamiento control. La industria panadera busca panes con una elasticidad mayor al 80%, para considerar que un pan es bueno. Todos los panes mostraron una elasticidad mayor al 80%.

6.3.1.4 Resiliencia

Los tratamientos presentan diferencia significativa, siendo el pan elaborado con la masa acidificada químicamente el que presenta una resiliencia mayor de (0.182), los otros tratamientos no presentan diferencia significativa entre ellos. Por lo que tienen la misma capacidad de recuperación.

Tabla 13. Resultados de Análisis de Perfil de Textura de los Panes

Tratamientos	Dureza g	Elasticidad	Resiliencia
Control	654.35±58.00 ^d	0.879±0.010 ^a	0.161±0.012 ^b
Ácido láctico	650.03± 5.70 ^d	0.810±0.012 ^c	0.181±0.007 ^a
<i>L. brevis</i>	1594.74±16.70 ^b	0.855±0.027 ^{ab}	0.157±0.008 ^b
<i>L. plantarum</i>	1318.67±84.69 ^c	0.836±0.027 ^{bc}	0.149±0.010 ^b
<i>L. sanfranciscensis</i>	1783.36±72.62 ^a	0.845±0.015 ^b	0.148±0.008 ^b
LSD	103.35	0.035	0.016

Letras iguales en las columnas, no hay diferencia significativa entre los tratamientos, con valores mayores al LSD indicado ($p > 0.5$)

6.3.2 Análisis de volumen específico de los panes

En la tabla 14 se muestran los resultados de volumen específico que fueron calculados para cada uno de los panes (volumen/peso). Hay diferencia significativa entre los tratamientos, los volúmenes de pan se incrementaron con la masa acidificada químicamente (3.84 ml/g) seguido del control (3.71 ml/g) y el pan con *L. plantarum* (3.18 ml/g), no habiendo diferencia de volumen entre el pan con *L. brevis* y *L. sanfranciscensis*.

Tabla 14. Volumen específico de los panes

Panes	Volumen específico (ml/g)
Control	3.71 ± 0.05 ^b
Ac. Láctico	3.84 ± 0.04 ^a
<i>L. brevis</i>	3.00 ± 0.06 ^d
<i>L. plantarum</i>	3.18 ± 0.05 ^c
<i>L. sanfranciscensis</i>	2.98 ± 0.04 ^d
LSD	0.087

Letras iguales en la columna, no hay diferencia significativa entre los tratamientos, con valores mayores al LSD indicado ($p > 0.5$)

6.3.3 Análisis de color de pan blanco

En la tabla 15 se muestran los valores de luminosidad obtenidos para cada uno de los panes elaborados figura 16. Existe diferencia significativa entre los tratamientos, el color de la costra fue característico del pan, siendo más oscuro el pan con *L. sanfranciscensis* (14.59), seguido del pan con ácido-láctico (17.25), no habiendo diferencia entre el pan con *L. brevis* y *L. plantarum*, el pan control fue menos oscuro. Es evidente que los panes elaborados con BAL son más oscuros, debido a que durante la cocción del pan se llevan a cabo reacciones de oscurecimiento entre ellas caramelización y maillard, para que se lleve a cabo la

reacción de caramelización, se requiere de temperaturas elevadas (220 ° C) y azúcares reductores (xilosa, glucosa, fructuosa, lactosa y la maltosa), condiciones que estuvieron presentes durante la elaboración de los panes. Para que se lleven a cabo las reacciones de maillard se requiere de grupos amino y azúcares reductores, los grupos amino están presentes debido a la actividad proteolítica de las BAL, que degradan las proteínas, resultando péptidos pequeños y un número mayor de grupos amino, lo que favorece el oscurecimiento del pan, en cuanto a los azúcares reductores ya mencionamos que están presentes. En un estudio realizado por Alvarez y colaboradores en el 2010, donde elaboraron pan conteniendo pseudocereales y pan libre de gluten, evalúan distintos parámetros entre ellos luminosidad a los panes, presentando valores de L* en un rango de (69.7 a 51.4).

Tabla 15. Color de la superficie de los panes

Panes	Luminosidad L*
Control	22.59 ± 1.13 ^a
Ác. Láctico	17.25 ± 1.14 ^c
<i>L. brevis</i>	20.31 ± 0.64 ^b
<i>L. plantarum</i>	21.41 ± 1.34 ^b
<i>L. sanfranciscensis</i>	14.59 ± 0.64 ^d
LSD	3.34

Letras iguales en la columna, no hay diferencia significativa entre los tratamientos, con valores mayores al LSD indicado ($p > 0.5$)

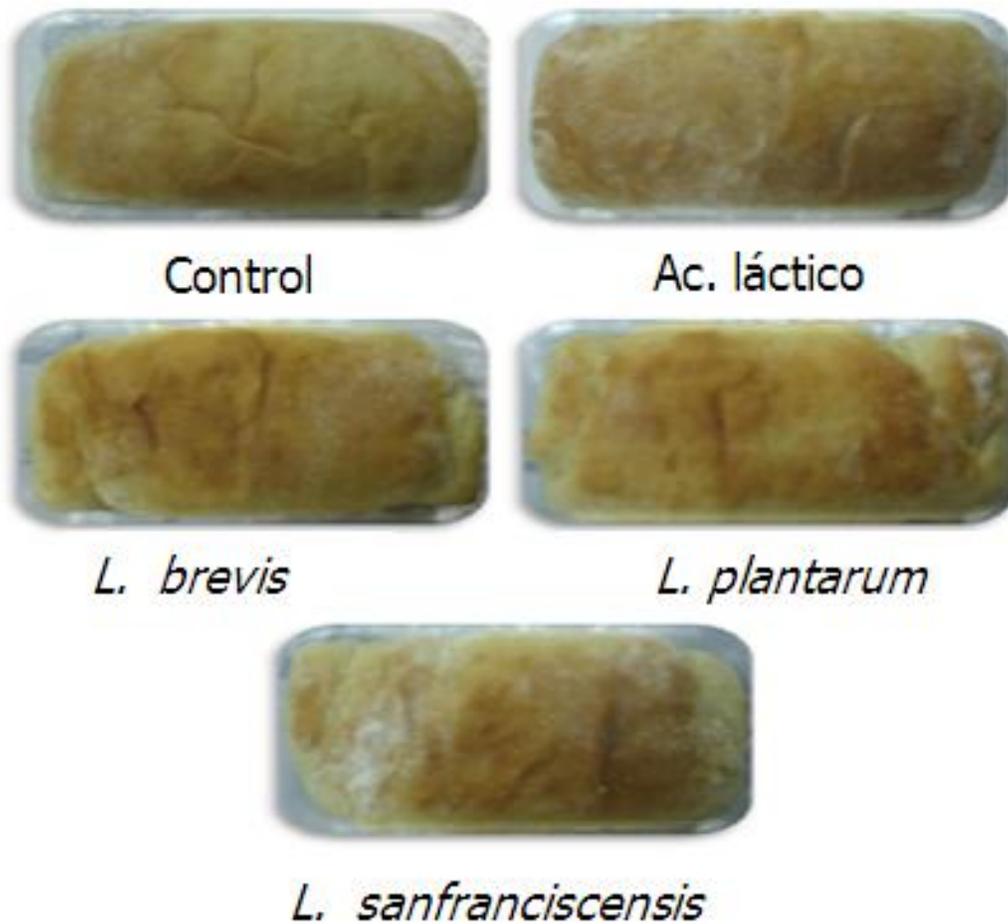


Figura 16 . Imagen de los panes elaborados

6.3.4 Análisis de humedad

En la tabla 16 se muestra el contenido de humedad realizado a los tratamientos, hay diferencia significativa entre ellos, siendo *L. plantarum* y *L. sanfranciscensis* quienes presentaron el mayor contenido de humedad (38.073 y 38.616) respectivamente, respecto a los demás tratamientos el control, ácido láctico y *L. brevis*, no mostrando diferencia significativa. Para los tratamientos que presentaron un mayor contenido de humedad, está relacionado con la producción de exopolisacáridos (EPS) que presentan algunas BAL durante el proceso de

fermentación, mismos que ayudan a formar una red tridimensional que estabiliza el producto final y contribuye a la retención de agua (Parra H.A.R, 2010).

Tabla 16. % de humedad

Tratamientos	% de humedad
Control	35.072±2.01 ^a
Ac. láctico	37.265±1.01 ^a
<i>L. brevis</i>	36.472±1.23 ^a
<i>L. plantarum</i>	38.073±.016 ^b
<i>L. sanfranciscensis</i>	38.616±1.03 ^b

Letras iguales en la columna, no hay diferencia significativa entre los tratamientos ($p>0.5$)

6.3.5 Análisis de cenizas

En la tabla 17 se muestran los resultados de contenido de cenizas realizados a los tratamientos, hay diferencia significativa entre los tratamientos, siendo el pan elaborado con la masas acidificada químicamente, el diferente a todos, presentando el menor porcentaje de cenizas (0.540), si hablamos de un porcentaje de cenizas menor, hablamos de un menor contenido de minerales. En los panes elaborados con masas agrias, tenemos una biodisponibilidad de los minerales presentes en la harina de trigo.

Tabla 17. % de cenizas

	% de cenizas
Control	0.656±0.06 ^a
Ac láctico	0.540±0.01 ^b
<i>L. brevis</i>	0.605±0.02 ^a
<i>L. plantarum</i>	0.654±0.03 ^a
<i>L. sanfranciscensis</i>	0.623±0.01 ^a
LSD	0.057

Letras iguales en la columna, no hay diferencia significativa entre los tratamientos, con valores mayores al LSD indicado ($p>0.5$)

6.3.6 Análisis de proteína

En la tabla 18 se muestran los resultados del porcentaje de proteína obtenidos para cada uno de los tratamientos. No existe diferencia significativa entre los tratamientos, teniendo valores en el rango de 10.21 a 10.26 % de proteína. No hay disminución de proteína en los tratamientos, debido a que la proteína solamente fue hidrolizada y sigue presente en los panes.

Tabla 18. % de proteína

Panes	% de proteína
Control	10.26 ± 0.07 ^a
Ac. Láctico	10.21 ± 0.03 ^a
<i>L. brevis</i>	10.24 ± 0.02 ^a
<i>L. plantarum</i>	10.26 ± 0.02 ^a
<i>L. sanfranciscensis</i>	10.23 ± 0.04 ^a
LSD	0.069

Letras iguales en la columna, no hay diferencia significativa entre los tratamientos, con valores mayores al LSD indicado ($p>0.5$)

6.3.7 Calidad de la miga de pan blanco

En la figura 17 se observa la calidad de la miga de cada uno de panes elaborados, las rebanadas del pan control y el elaborado con masa acidificada químicamente presentan una miga con alveolos más cerrados y no homogéneos, para las rebanadas de pan elaborados con masas fermentadas, presentan muchos alveolos pequeños y distribución uniforme, debido a que en la ruta metabólica que siguen las bacterias ácido-lácticas existe la producción de CO_2 . El CO_2 queda atrapado en la red tridimensional que se forma durante la formación de la masa.

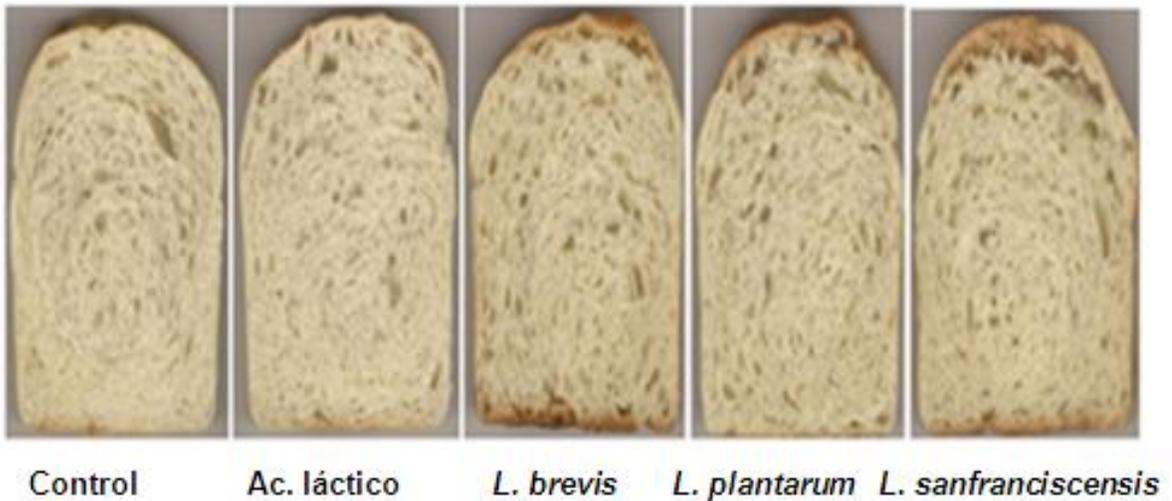


Figura 17. Imagen de las rebanadas de pan blanco

7 Conclusiones

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos podemos concluir que:

- Las masas adicionadas con BAL mostraron una disminución de pH, a diferencia de lo observado en el control y la masa acidificada químicamente, donde no mostraron cambio, lo que se atribuye al tiempo de fermentación, ya que tiempos más largo favorecen la actividad proteolítica de las BAL presentes en las masas. Con la disminución de pH se ve favorecida la activación de las enzimas propias de la harina (proteinasas y peptidasas), por lo que se logra la formación de péptidos pequeños y aminoácidos.
- Ya mencionamos la disminución de pH, por lo que debe ser evidente la producción de ácido láctico, donde se inocularon BAL en las masas, la producción de ácidos orgánicos en las masas, nos refiere que el pan elaborado va hacer un producto con bajo índice glicémico, por lo que podemos decir que es un pan saludable, los mejores resultados en cuanto a pH y porcentaje de ácido láctico fueron para *L. brevis* y *L. sanfranciscensis*.
- En la determinación de Nitrógeno Amino Primario, para las masas inoculadas con *L. brevis* y *L. sanfranciscensis*, hubo una mayor proteólisis que el control, lo que nos sugiere que los resultados de pH y el porcentaje de ácido láctico, concuerdan con los valores de NAP obtenido en los tratamientos. Si tenemos un número mayor de aminoácidos, el producto va a tener mejores características en cuanto olor y sabor.

- Con la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, demostramos la degradación de las proteínas del trigo, siendo evidente que después de 24 horas de fermentación, las bandas que mostraron una degradación mayor fueron las albuminas y globulinas, para las masas inoculadas con *L. brevis* y *L. sanfranciscensis*, en la masa acidificada químicamente también una proteólisis, el control mostro una degradación menor, hubo menos bandas presentes en las fracciones de albuminas y globulinas.
- Los panes con BAL presentaron una menor suavidad, siendo entre ellos el más suave el elaborado con que, *L. plantarum* seguido *L. brevis* y por ultimo *L. sanfranciscensis*. En cuanto a suavidad comparado con los otros panes que contenían BAL el mejor es *L. plantarum*, pero comparado con el control y ácido láctico estos dos últimos son aun mejores que los adicionados con BAL.
- Los panes elaborados con las masas inoculadas con las BAL, tuvieron un color, sabor y olor característico de productos fermentados, teniendo un mayor contenido de humedad el pan elaborado con la masa que contenía *L. sanfranciscensis*.
- Concluyendo que las cepas de *L. sanfranciscensis* y *L. brevis* mostraron los mejores resultados y podemos decir que los panes elaborados son mas saludables, nutritivos y de mejores características sensoriales.

8 Bibliografía

Alvarez, J. L., Auty, M., Arendt, K. E., Gallagher, E. 2010. Baking properties and microstructure of pseudocereal flours in gluten-free bread formulations. *Eur Food Res Technol*, 230, 437-445.

AOAC. 1980. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.

AOAC. 920.87. Determination of protein in food according to the Kjeldahl method. BÜCHI. 027/2010.

Axelsson L. 1993. Lactic acid bacteria: classification and physiology. En *Lactic Acid Bacteria*. Salminen, S. 1^{er} ed. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, pp. 1-11.

Bordons A. 1997. "Criterios de valoración de la calidad de la uva ". Riojas. *Las bacterias lácticas del vino y la fermentación maloláctica*. Ediciones Ayuntamiento de Haro. España, pp. 9-31.

Buchanan R. & Gibbons. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8^{va} ed. Board, Baltimore, pp. 580-585.

Bourne, M. C. 1978. *Basic Principles of Food Texture Measurement*. Lecture text of Dough Rheology and Baked Products Texture Workshop - Chicago.

Camacho de la R., Díaz G., Santillana H., Velázquez M. 2004. *Productos de cereales y leguminosas*. México D.F, Facultad de química, pp. 47.

Casp. A., Abril, J. 1999. Proceso de conservación de alimentos, 1^{er} edición. Ediciones Mundi-Prensa, pp. 95-99, 109-113.

Charley Helen. 2009. Tecnología de alimentos: Procesos químicos y físicos en la preparación de alimentos. México: Limusa, pp. 208.

Clarke C.I., Shober T.J., Dockery P., O'Sullivan K., Arendt E.K. 2004. Wheat sourdough fermentation: effects of time and acidification on fundamental rheological properties.

Colombo A., Robotta P.D., León A.E. 2008. Use of capillary electrophoresis for characterization of Argentinean wheat gliadins. *Agrisciencia XXV*, 2: 57-64.

Corssetti, A., Sattanni, L. 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40, 539-558.

De Angelis, M., Di Cagno, R., Gallo, G., Curci, M., Siragusa, S., Crecchio, C., Parente, E. y Gobbetti, M. 2007. Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*. 144: 69-82.

Di-Cargo, R., De Angelis, M., Lavermicocca, P., De Vincenzi, M., Giovannini, C., Faccia, M. y Gobbetti, M. 2002. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: Effects on wheat flour protein fractions and gliadina peptides involved in human cereal intolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 623-633.

FAO. 1990. Utilización de alimentos tropicales: cereales; alimentación y nutrición. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma, pp. 55.

Gänzle, M., Loponen, J. y Gobbetti, M. 2008. Proteolysis in sourdough fermentation: Mechanisms and potential for improved bread quality. Trends in Food Sci & Tech. 19: 513-521.

Goesaert, H., Bris, K., Veraberbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K. and Delcour, J. A. 2005. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. Trends in Food Science & Technology, 16: 12-30.

http://www.harina.org/trigo_mexico.php

INEGI 2010. Estadística a propósito del día mundial de la diabetes. Datos nacionales.1:8

Kedia, G., Vázquez, J., Pandiella, S. 2008. Fermentability of whole oat flour, PeriTec flour and bran by *Lactobacillus plantarum*. Journal of Food Engineering, 89, 246-249.

Kohli, M. M. y D. Martino. 1998. Explorando altos rendimientos de trigo. La Estanzuela, Uruguay: CIMMYT-INIA.

Korakli, M., A. Rossmann, M., Gänzle y Volgel. 2001. Sucrose metabolism and exopolysaccharides production in wheat and rye sourdoughs by *Lactobacillus sanfranciscensis*. J. Agric. Food Chem. 49: 5194-5200.

Lacaze, G., Wick, M. y Cappelle, S. 2007. Emerging fermentation technologies: Development of novel sourdoughs. *Food Microbiol.* 24: 15-160.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.

León, A., Montoya, O., Motato, K., Granda, D., Caro, C., Restrepo, J., Echeverri, S., Valencia, J. y Quinchía, L. 2006. Bacterias ácido lácticas (BAL) silvestres colombianas presentan propiedades adecuadas para la fabricación de masa ácida. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica.* 13: 26-35.

Liljeberg, H., Lönner, H. y Björck, I. 1995. Sourdough Fermentation or Addition of Organic Acids or Corresponding Salts to Bread Improves Nutritional Properties of Starch in Healthy. *J. Clin. Nutr.* 125: 1503-1509.

López, H., Krespine, V., Guy, C.; Messenger, A., Demigne, C. y Remesy, C. 2001. Prolonged fermentation of whole wheat sourdough reduces phytate level and increases soluble magnesium. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2657-2662.

Osborne, T. B. 1924. *The Vegetable Proteins*, 2nd edn, Longmans Green and Co., London.

Parra, H. A. R. 2010. Review. Bacterias Ácido-Lácticas: papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias.* 8: 93-105.

SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2007.

Salminen S., Ahokas J.T., Axelsson L.T., Ballongue J., Bigret M., Davidson P., Deighton. P., Donohue D.C., Fonden R. 1993. Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen S, von Wriqth A, eds. Lactic acid bacteria. New York: Marcel Dekker Inc., pp. 1-53.

Serna S.S. 2003. Manufactura y control de calidad de productos basados en cereals AGTE. México: SIA.

Simonson L., Salovaara H., Korhola M. 2003. Response of wheat sourdough parameters to temperature, NaCl and sucrose variations. Food Microbiology. 20: 193-199.

Sneath, H.A.P., Mair, S.N., Sharpe, E.M. y Holt. G.J. 1986. Bergey's Manual of Sytemaric Bacteriology. 2^{da} ed, Board, pp. 1209-1233.

Thiele, C., Grassl, S. y Gänzle, M. 2004. Gluten hydrolysis and depolymerization during sourdough fermentation. J. Agric. Food Chem. 52: 1307-1314.

Villanova, R.B., Guerra, H. E. 2010. Tratado de Nutrición. Tomo II. Cereales y Productos Derivados. 2^{da} ed, Medica Panamericana. Madrid, pp. 97-135.

Yam, L.K., Papadakis, E. S. 2004. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surface. Journal of Food Engineering. 61: 137-142.

Zamudio, M., Karin, L. 2005. Lactobacilos nativos productores de exopolisacáridos de interés biotecnológico. Universidad Nacional Mayor de San Francisco Fundada en 1551. (Titulo Profesional) en línea URL. http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2005/zamudio_mk/pdf/zamudio_mk-TH.2.pdf.

Zotta, T., Piraino, P., Ricciardi, A., Ricciardi, A., McSweeney, P. y Parente, E. 2006. Proteolysis in model sourdough fermentations. J. Agric. Food Chem. 54: 2567-2574.

9 Apéndices

9.1 Preparación de solución

9.1.1 Soluciones para el método de TNBS

- Solución de L-leucina mM en 1 % de SDS para la curva patrón

Pesar 0.065 g de L-leucina, 1 g de SDS y agregarlo en 50 ml de agua destilada, disolver bien y posteriormente aforar la solución 100 ml.

- Buffer de fosfato a pH 8.2

Pesar 0.6 g de NaH_2PO_4 agregar 10 ml de agua desionizada, aforar la solución a 25 ml. Pesar 1.419 g de Na_2HPO_4 adicionar 90 ml de agua desionizada, agregar de la solución de NaH_2PO_4 hasta tener un pH de 8.2 aforar a 100 ml.

- Solución 0.1 % de TNBS

Esta solución se prepara en el momento de una solución al 5 % p/v, se tomaron 200 μl aforados a 10 ml, en un matraz cubierto con aluminio y en la campana.

- Solución de Sulfito de Sodio al 0.1 N

Pesar 0.315 g de Na_2SO_4 adicionar 20 ml de agua desionizada, disolver y aforar a 50 ml.

9.1.2 Soluciones para electroforesis

- Solución de monómeros de acrilamida (Acrilamida 30 % T, 2.67 % C)

Pesar 29.2 g de acrilamida; 0.8 g de bis-acrilamida, disolver en aproximadamente 70 ml de agua mili-Q, aforar a 100 ml. Guardar en botella ámbar de vidrio y en refrigeración (\leq a 1 mes).

- Amortiguador del gel separador pH 8.8

Pesar 18.17 g de Tris base; disolver en aproximadamente 60 ml de agua mili-Q, ajustar pH a 8.8 con HCl 6 N aforar a 100 ml. Guardar en refrigeración.

- Amortiguador del gel compactador pH 6.8

Pesar 6 g de Tris base; disolver en aproximadamente 60 ml de agua mili-Q, ajustar pH a 6.8 con HCl 6N aforar a 100 ml. Guardar en refrigeración.

- Amortiguador de la cámara pH 8.3 (solución 10X)

Pesar 9 g de Tris base; 57.6 g de glicina; 4 g de SDS; disolver en aproximadamente 200 ml de agua mili-Q. (Si las pesadas son correctas debe evitarse el ajuste de pH para no alterar la fuerza iónica de la solución). Aforar a 300 ml. Guardar a temperatura ambiente. Diluir 10 veces al momento de utilizar

- Persulfato de amonio

Preparar al momento una solución al 10 %. Este es muy higroscópico (sellar bien y mantener en desecador). Pesar 0.02 g + 200 µl de agua mili-Q.

- Solución de SDS al 10 %

Pesar 1 g de SDS disolver en 10 ml de agua mili-Q. Guardar en botella de vidrio a temperatura ambiente

- Solución fijadora

40 ml de metanol + 10 ml de ácido acético + 50 ml de agua mili-Q.

- Tinción

- a) Pesar 2.5 g del agente acelerador (Silver Stain Plus 161-0448) + 50 ml de agua mili-Q.
- b) En otro matraz pequeño, adicionar:
 - 5 ml SSP Image DR
 - 5 ml SPS Complex
 - 5 ml SSP Reductor
 - 35 ml de agua mili-Q

La solución a y b se mezclan en el momento.

➤ Gel de Separación al 12 %

Agua mili-Q	1.675 ml
Buffer 1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.25 ml
Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10 %	50 μ l
Acrilamida/bis	2 ml
Persulfato de amonio al 10%	25 μ l
TEMED	5 μ l

➤ Gel de concentración al 4 %

Agua mili-Q	2.03 ml
Buffer 1.5 M Tris-HCl pH 6.8	0.83 ml
Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10 %	33.3 μ l
Acrilamida/bis	0.5 ml
Persulfato de amonio al 10%	20 μ l
TEMED	10 μ l

9.1.3 Pesos moleculares de referencia

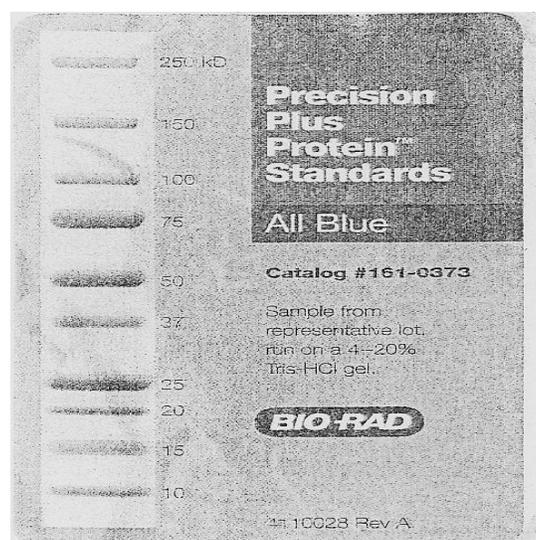


Figura 18. Pesos moleculares de referencia

9.2 Curvas patrón

9.2.1 Curva patrón de L-leucina

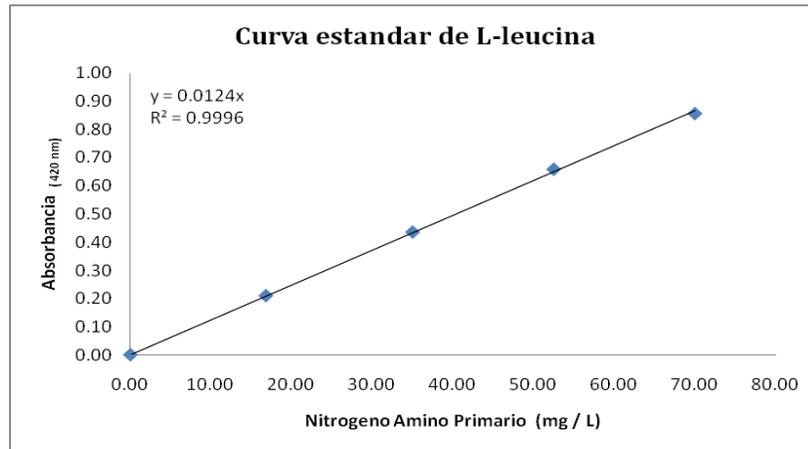


Figura 19. Curva estándar de L-leucina

9.2.2 Curva de referencia para estimar los pesos moleculares

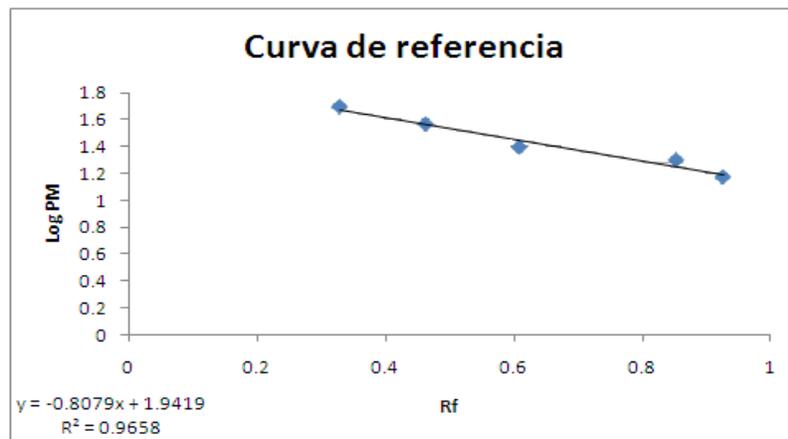


Figura 20. Curva de referencia para estimar los PMs