



**FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**ESCUELA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS**

**“Determinación de la factibilidad del uso de la bacteria  
Lactobacillus plantarum, aplicada a masas de harina de  
trigo para la reducción del gluten”.**

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:**

**INGENIERO EN ALIMENTOS**

**Autor:**

**XAVIER EDUARDO GALINDO ORELLANA**

**Director:**

**CLAUDIO ESTEBAN SÁNCHEZ JÁUREGUI**

**CUENCA, ECUADOR**

**2016**

**DEDICATORIA**

A Javier y Consuelo....

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

|                                                      |           |
|------------------------------------------------------|-----------|
| DEDICATORIA .....                                    | ii        |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS .....                           | iii       |
| ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....                         | vi        |
| ÍNDICE DE TABLAS .....                               | vii       |
| ÍNDICE DE ANEXOS.....                                | viii      |
| RESUMEN.....                                         | ix        |
| ABSTRACT .....                                       | x         |
| <br>                                                 |           |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>                            | <b>1</b>  |
| <br>                                                 |           |
| OBJETIVO GENERAL: .....                              | 3         |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....                          | 3         |
| <br>                                                 |           |
| <b>CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>      | <b>4</b>  |
| <br>                                                 |           |
| 1.1 El trigo.....                                    | 4         |
| 1.2 Aspectos nutricionales .....                     | 5         |
| 1.3.1 Acción del gluten en la panificación.....      | 7         |
| 1.3.5 Hidrólisis de gluten por vía fermentativa..... | 10        |
| 1.4 Intolerancia algluten.....                       | 11        |
| 1.5 Microorganismos BAL.....                         | 13        |
| 1.6 Masas fermentadas con LAB. ....                  | 14        |
| <br>                                                 |           |
| <b>CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>       | <b>17</b> |
| <br>                                                 |           |
| 2.1 Microorganismos y medio de cultivo.....          | 17        |
| 2.3 Sustrato.....                                    | 18        |
| 2.4 Propiedades fisicoquímicas .....                 | 19        |
| 2.5 Recuento en placa (UFC/ml).....                  | 19        |
| 2.6 Microscopía.....                                 | 20        |
| 2.7 Aislamiento de bacterias .....                   | 21        |
| 2.7.1 Siembra. ....                                  | 21        |
| 2.7.2 Inoculación.....                               | 21        |
| 2.7.3 Operaciones unitarias .....                    | 21        |

|                                                                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.7.4 Leudado.....                                                                                                                           | 22        |
| 2.7.5 Horneado .....                                                                                                                         | 23        |
| 2.8 Masas madre.....                                                                                                                         | 23        |
| 2.9 Propiedades físicas otorgadas al gluten.....                                                                                             | 24        |
| 2.10 Amasado intenso. ....                                                                                                                   | 25        |
| 2.10.1 Mezcla doligero.....                                                                                                                  | 25        |
| 2.10.2 Formulación de masa para pan.....                                                                                                     | 26        |
| 2.11 Análisis ELISA .....                                                                                                                    | 27        |
| 2.11.1 Preparación y extracción de la muestra.....                                                                                           | 27        |
| 2.11.2 Procedimiento: .....                                                                                                                  | 28        |
| 2.11.3 Interpretación de los resultados.....                                                                                                 | 30        |
| Límite de cuantificación .....                                                                                                               | 30        |
| Rango de cuantificación.....                                                                                                                 | 30        |
| 2.12 Determinación de vida útil .....                                                                                                        | 30        |
| 2.13 Análisis realizados. ....                                                                                                               | 31        |
| 2.13.1 Sensoriales .....                                                                                                                     | 31        |
| 2.13.2 Microbiológicos .....                                                                                                                 | 32        |
| 2.14 Determinación de vida útil mediante software STATGRAPHICS Centurión... 33                                                               |           |
| <br>                                                                                                                                         |           |
| <b>CAPÍTULO III: RESULTADOS .....</b>                                                                                                        | <b>34</b> |
| <br>                                                                                                                                         |           |
| 3.1 DETERMINACIÓN DE VIDA ÚTIL .....                                                                                                         | 34        |
| 3.1.2 Aceptación sensorial. ....                                                                                                             | 34        |
| 3.1.3 Aroma.....                                                                                                                             | 34        |
| 3.1.4 Apariencia .....                                                                                                                       | 35        |
| 3.1.5 Textura .....                                                                                                                          | 36        |
| 3.1.6 Sabor .....                                                                                                                            | 37        |
| 3.1.7 Miga .....                                                                                                                             | 38        |
| 3.1.8 Color.....                                                                                                                             | 39        |
| 3.2 Análisis microbiológico. ....                                                                                                            | 40        |
| 3.3 Vida útil.....                                                                                                                           | 41        |
| 3.3.2 Temperatura Sierra S .....                                                                                                             | 44        |
| 3.3.3 Temperatura Costa O .....                                                                                                              | 46        |
| 3.4 Hidrólisis de proteínas .....                                                                                                            | 50        |
| 3.5 Diferencia entre las cantidades de gliadina de las muestras preparadas,<br>comparadas con un pan comercial de expendio en la ciudad..... | 51        |

|                           |    |
|---------------------------|----|
| <b>DISCUSIÓN</b> .....    | 52 |
| <b>CONCLUSIONES</b> ..... | 55 |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b> ..... | 56 |

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1: Partes del grano de trigo.....                                                                                                                 | 15 |
| Figura 2.1: Vía proteolítica de las proteínas del gluten .....                                                                                             | 21 |
| Figura 3.1: Manifestaciones clínicas de la enfermedad celíaca caracterizada como un Iceberg.....                                                           | 22 |
| Figura 4.2: Lyofast LPRA (Lactobacillus plantarum; Lactobacillus rhamnosus) .....                                                                          | 28 |
| Figura 5.2: L. plantarum.....                                                                                                                              | 29 |
| Figura 6.2: L. rhamnosus .....                                                                                                                             | 29 |
| Figura 7.2: Diluciones y siembra de bacterias .....                                                                                                        | 30 |
| Figura 8.2: Diferenciación de cepas por observación en microscopio con método de tinción de Gram.....                                                      | 31 |
| Figura 9.2: Crecimiento de colonias de L. plantarum en agar MRS.....                                                                                       | 32 |
| Figura 10.2: Estructura de gluten en modo de relajación y en modo extendido.....                                                                           | 36 |
| Figura 11.3: Comparación del desarrollo de aroma con relación al tiempo entre las muestras S y O para condiciones ambientales Costa y Sierra .....         | 47 |
| Figura 12.3: Comparación del desarrollo de la apariencia con relación al tiempo entre las muestras S y O para condiciones ambientales Costa y Sierra ..... | 48 |
| Figura 13.3: Comparación del desarrollo de aroma con relación al tiempo entre las muestras S y O para condiciones ambientales Costa y Sierra .....         | 49 |
| Figura 14.3: Comparación del desarrollo de la textura con relación al tiempo entre las muestras S y O para condiciones ambientales Costa y Sierra .....    | 50 |
| Figura 15.3: Comparación del desarrollo de la miga con relación al tiempo entre las muestras S y O para condiciones ambientales Costa y Sierra .....       | 51 |
| Figura 16.3: Comparación del color con relación al tiempo entre las muestras S y O para condiciones ambientales Costa y Sierra .....                       | 52 |
| Figura 17.3: Weibull Porcentaje acumulado .....                                                                                                            | 54 |
| Figura 18.3: Histograma de Distribución Wellbull Ajustada.....                                                                                             | 55 |
| Figura 19.3: Histograma de Distribución Wellbull Ajustada.....                                                                                             | 55 |
| Figura 20.3: Wellbull porcentaje acumulado S sierra.....                                                                                                   | 56 |
| Figura 21.3: Histograma de Distribución Wellbull ajustada S sierra.....                                                                                    | 57 |
| Figura 22.3: Probabilidad de supervivencia S sierra.....                                                                                                   | 57 |
| Figura 23.3: Weibull Costa O .....                                                                                                                         | 58 |
| Figura 24.3: Histograma de Distribución Weibull ajustada Costa O.....                                                                                      | 59 |
| Figura 25.3: Probabilidad de supervivencia Costa O.....                                                                                                    | 59 |
| Figura 26.3: Weibull Costa S .....                                                                                                                         | 60 |
| Figura 27.3: Histograma de distribución Weibull Ajustada Costa .....                                                                                       | 61 |
| Figura 28.3: Probabilidad de supervivencia Costa Tabla 14 Valores .....                                                                                    | 61 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1: Valores nutricionales de la harina de trigo.....                                                                                                     | 37 |
| Tabla 2.2: Formulación de panes S y O.....                                                                                                                    | 37 |
| Tabla 3.2: Tabla de calificación de desarrollo con relación al tiempo de aroma en catas de pan (S yO). .....                                                  | 47 |
| Tabla 4.3: Tabla de calificación de desarrollo de apariencia con relación al tiempo en catas de pan (S yO).....                                               | 48 |
| Tabla 5.3: Tabla de calificación de desarrollo de textura con relación al tiempo en catas de pan (S yO). .....                                                | 49 |
| Tabla 6.3: Tabla de calificación de desarrollo de sabor con relacion al tiempo en catas de pan (S y O) .....                                                  | 50 |
| Tabla 7.3: Tabla de calificación de desarrollo de la miga con relacion al tiempo en catas de pan (S y O) .....                                                | 51 |
| Tabla 8.3: Tabla de calificación de desarrollo de color con relacion al tiempo en catas de pan (S y O) .....                                                  | 52 |
| Tabla 9.3: Crecimiento microbiológico (hongos y levaduras) en las muestras S y O entre 2 y 9 días para condiciones sierra .....                               | 53 |
| Tabla 10.3: Crecimiento microbiológico (hongos y levaduras) en las muestras S y O entre 2 y 9 días para condiciones costa .....                               | 53 |
| Tabla 11.3: Valores críticos O sierra .....                                                                                                                   | 55 |
| Tabla 12.3: Valores críticos Sierra S .....                                                                                                                   | 57 |
| Tabla 13.3: Valores críticos Costa O .....                                                                                                                    | 59 |
| Tabla 14.3: Valores críticos Costa .....                                                                                                                      | 61 |
| Tabla 15.3: Valores críticos Costa S.....                                                                                                                     | 61 |
| Tabla 16.3: Valores de disminución de gliadina en masa inoculada con <i>L. plantarum</i> ; y con mezcla de sepas, comparadas con una masa sin fermentar ..... | 62 |
| Tabla 17.3: Diferencia entre las cantidades de gliadina de las muestras preparadas, comparadas con un pan comercial de expendio en la ciudad.....             | 63 |
| Tabla 18.3: Valores de comparación entre masas inoculadas, pan elaborado base de masa fermentada y un pan comercial de expendio en la ciudad .....            | 63 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Anexo 1.1: Separacion y reproduccion de bacterias lacticas.....                                                        | 68 |
| Anexo 2.3: Cepas lácticas provenientes de mezcla LPRA .....                                                            | 68 |
| Anexo 3.3: Aislamiento de cepas por especificación de medio de crecimiento .....                                       | 69 |
| Anexo 4.3: Reproducción de cepas aisladas en caldo MRS con pH específico para crecimiento óptimo .....                 | 69 |
| Anexo 5.3: Conteo microbiano en leche inoculada con bacterias aisladas .....                                           | 70 |
| Anexo 6.3: Leche inoculada con <i>L. plantarum</i> y LPRA .....                                                        | 70 |
| Anexo 7.3: Masa madre a base de harina de trigo y leche inoculada con <i>Lactobacillus plantarum</i> relación 1:1..... | 71 |
| Anexo 8.3: Panes O y S al salir del horno .....                                                                        | 71 |
| Anexo 9.3: Panes O y S diferencia de la miga en un corte transversal .....                                             | 72 |
| Anexo 10.3: Valores de absorbancia y ppm obtenidos mediante método ELISA ....                                          | 72 |
| Anexo 11.3: Extracción de muestras de panes y masas .....                                                              | 74 |
| Anexo 12.3: Kit análisis ELISA .....                                                                                   | 74 |
| Anexo 13.3: Procedimiento para prueba de análisis ELISA .....                                                          | 75 |
| Anexo 14.3: Muestras listas para análisis de absorbancia .....                                                         | 75 |
| Anexo 15.3: Equipo de Análisis de absorbancia ELISA Neogen .....                                                       | 76 |
| Anexo 16.3: Masa Viscosidad de la masa al inicio del fermen .....                                                      | 76 |
| Anexo 17.3: Viscosidad de la masa a los 5 días de fermentación láctica .....                                           | 77 |
| Anexo 18.3: Crecimiento microbiano ausente en los panes O y S en los días 2-6 ...                                      | 78 |
| Anexo 19.3: Crecimiento de moho evidente en el pan O al día 12 .....                                                   | 78 |
| Anexo 20.3: Crecimiento microbiano en muestras O y S al día 12 de la prueba .....                                      | 79 |
| Anexo 21.3: Instalación de panel de catación para la evaluación de las muestras ...                                    | 79 |
| Anexo 22.3: Tabla de valores de aceptación o rechazo para análisis de vida útil ....                                   | 80 |
| Anexo 23.3: Tabla de Formulación pan libre de gluten .....                                                             | 80 |
| Anexo 24.3: Tabla crecimiento bacteriano en masas acidas con 4 tipos .....                                             | 81 |
| Anexo 25.3: Ilustración, Fundamento Análisis ELISA .....                                                               | 81 |
| Anexo 26.3: Ilustración, Compuestos anti fúngicos producidos por bacterias ácido lácticas .....                        | 82 |

**“DETERMINACIÓN DE LA FACTIBILIDAD DEL USO DE LA BACTERIA LACTOBACILLUS PLANTARUM, APLICADA A MASAS DE HARINA DE TRIGO PARA LA REDUCCIÓN DEL GLUTEN.**

**RESUMEN**

Se determinó la factibilidad de la aplicación de bacterias del género *Lactobacillus plantarum* a masas de trigo fermentadas, a fin de reducir la cantidad de gluten. Se aisló cepas específicas de bacterias lácticas, a las cuales se les acondicionó y multiplicó para aplicarlas a las masas de harina de trigo para su fermentación. Se evaluó cuantitativamente la reducción de gliadina final por ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas, se determinó el tiempo de vida útil, se determinó la factibilidad del uso del método. Los resultados obtenidos concretaron que la bacteria efectivamente redujo la cantidad de gliadina final aproximadamente en un 25%, además los compuestos del metabolismo de las bacterias limitaron la proliferación de hongos y levaduras otorgando al producto una vida de anaquel mayor.

**Palabras Clave:** Lactobacillus plantarum, trigo, gluten, reducción de gliadina, pan, fermentación de masas.



Claudio Esteban Sánchez Jáuregui

**Director de Titulación**



Fausto Tobías Parra Parra

**Director de Escuela**



Xavier Eduardo Galindo Orellana

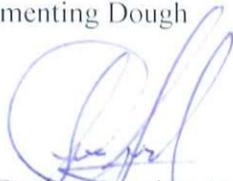
**Autor**

**DETERMINING THE FEASIBILITY OF THE USE OF BACTERIA  
LACTOBACILLUS PLANTARUM, APPLIED TO WHEAT FLOUR  
DOUGH FOR GLUTEN REDUCTION**

**ABSTRACT**

The feasibility of applying bacteria *Lactobacillus plantarum* to fermented wheat dough was determined in order to reduce the amount of gluten. Specific strains of conditioned and multiplied lactic acid bacteria were isolated so as to be applied to wheat flour dough for fermentation. The reduction of final gliadin was assessed quantitatively by an enzyme-linked immunosorbent assay. Its useful life and the feasibility of using the method were established. The results obtained determined that bacteria effectively reduced the amount of final gliadin in approximately 25%. In addition, bacteria metabolism compounds limited fungi and yeasts proliferation, giving the product greater shelf-life.

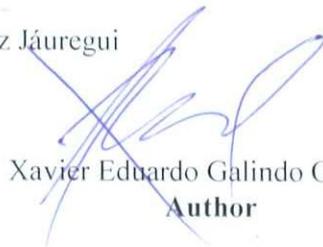
**Keywords:** *Lactobacillus Plantarum*, Wheat, Gluten, Gliadin Reduction, Bread, Fermenting Dough



Claudio Esteban Sanchez Jáuregui  
**Thesis Director**



Fausto Tobías Parra Parra  
**School Director**



Xavier Eduardo Galindo Orellana  
**Author**



UNIVERSIDAD DEL  
AZUAY  
Dpto. Idiomas



Translated by,  
Lic. Lourdes Crespo

Galindo Orellana Xavier Eduardo

Trabajo de Titulación

Ing. Claudio Sánchez Jáuregui

Junio, 2016.

## **DETERMINACIÓN DE LA FACTIBILIDAD DEL USO DE LA BACTERIA LACTOBACILLUS PLANTARUM, APLICADA A MASAS DE HARINA DE TRIGO PARA LA REDUCCIÓN DEL GLUTEN.**

### **INTRODUCCIÓN**

Las bacterias ácido lácticas, son microorganismos que han demostrado causar efectos benéficos a su huésped, son resistentes a un amplio rango de pH, capaces de colonizar el intestino humano, producir metabolitos con acción antimicrobiana, además de sustancias anticancerígenas, brindan protección contra la invasión de bacterias patógenas, refuerzan el sistema inmunológico humano y disminuyen la incidencia y duración de ciertas enfermedades intestinales (Zaira, 2009).

Muchas de las cepas de bacterias ácido lácticas (BAL), se incorporan en la composición de ciertos alimentos, con la finalidad de mejorar el sabor, aroma y vida de estante de productos procesados, cada una de las cepas brindan diferentes características, y dan opciones para nuevos tratamientos tecnológicos, para dar nuevos valores agregados a los productos (Pepea, 2004).

Desde tiempos antiguos, la humanidad ha conseguido una gran fuente de nutrientes, carbohidratos, fibra, proteína y minerales, provenientes del trigo, y su presentación más versátil, el pan. La aceptación del producto por parte de los consumidores se basa en la frescura, sabor textura, aroma y apariencia los cuales determinarán la calidad del producto final (Pepea, 2004).

La vida de estante de los productos panaderos es relativamente corta, debido al crecimiento fúngico y bacteriano del cual son vulnerables. Dichos microorganismos

cambian las características de los productos farináceos otorgando olores desagradables, decoloración de corteza y cambios en su textura causado por la degradación de almidones y proteínas (Olimpia Pepea, 2004).

La enfermedad celíaca se presenta al existir una atrofia de la vellosidad intestinal, la cual se desencadena por la presencia de las proteínas del gluten y las prolaminas del trigo, cebada y avena. A la fecha, el único tratamiento efectivo contra la celiaquía es la eliminación del gluten de la dieta, lo que conlleva a la eliminación del consumo de los cereales previamente mencionados y sus subproductos.

Los productos libres de gluten presentes en el mercado, son generalmente de una calidad inferior, comparados con los que contienen gluten en su composición, ya que el gluten brinda propiedades reológicas y tecnológicas únicas, que no han podido ser suplantadas por ningún aditivo. La ausencia del gluten en un producto como el pan, representa que se pierda la estructura proteica que este provee, convirtiendo al producto en un elaborado a base de almidones y aditivos.

Además de brindar las características reológicas, el gluten también ayuda en la estabilidad del producto con relación al tiempo, evitando una degradación de la miga acelerada, cosa que se da en productos con ausencia de gluten (Rositsa Denkova, 2014).

**OBJETIVO GENERAL:**

- Elaborar un producto fermentado a base de harina de trigo, con bacterias del género *Lactobacillus plantarum*, con un contenido reducido de gliadina en su composición final.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Aislar, reproducir y acondicionar bacterias del género *Lactobacillus plantarum*.
- Aplicar las bacterias a la fermentación de masas de harina de trigo con dos tipos de proceso físico diferente.
- Evaluar el nivel de gliadina luego de la fermentación de las masas
- Evaluar las diferencias en el metabolismo de la gliadina según la operación unitaria otorgada a la masa.

## CAPÍTULO I

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 1.1 El trigo

Se denomina trigo al conjunto de cereales del género *triticum* de la familia de las gramíneas, cuyo cultivo ha sido extendido en todo el mundo. El trigo es uno de los cereales más cultivados mundialmente, siendo usado tanto para consumo humano como para consumo en piensos animales. Para consumo humano, el trigo es consumido en forma de harina, harina integral, sémola y malta, así como una inmensa variedad de subproductos de estos como: pan, galletas, cerveza, whisky, pasta, cereales para desayuno, etc. Los granos de trigo son carióspsides de forma ovalada, que poseen tres partes principales: salvado, germen y endospermo. El salvado constituye la parte externa del grano, el germen es el embrión del grano, y el endospermo es la parte más interna, que sirve de depósito de nutrientes para el embrión, siendo el endospermo el representante del 82% del peso del grano. El endospermo está principalmente formado por almidón y proteínas, presenta un bajo contenido de vitaminas y minerales; su textura está definida por la concentración de proteínas y almidón, catalogándose como vítrea o harinosa.

Las aptitudes panaderas de un trigo, se ven afectadas por la dureza del endospermo, siendo la categoría de trigos fuertes los más aceptados, dado su alto contenido proteico, que ayuda a la obtención de volumen en la panificación. Gómez en 2006, clasificó a las proteínas del trigo en dos grupos, las formadoras de gluten y las que no forman gluten en el amasado, siendo las primeras representantes de entre un 75-80% del total de proteínas, y las no glutenizables 20-25% del total, y es en éstas donde se encuentran casi la totalidad de las enzimas.

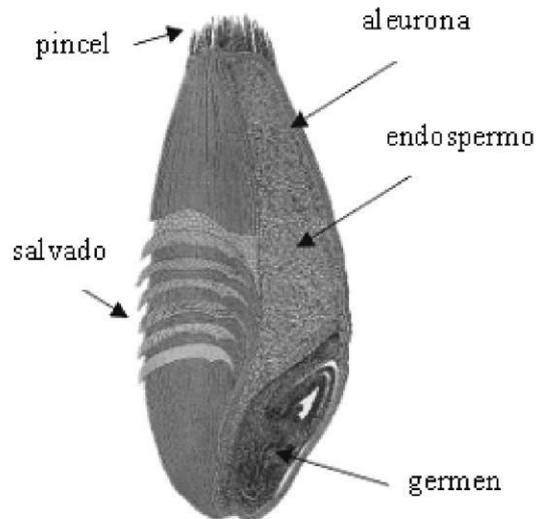


Figura 1: Partes grano de trigo  
Fuente: Manuel Gómez Pallarés, 2006.

## 1.2 Aspectos nutricionales

El trigo ha sido base en la alimentación de la humanidad desde tiempos muy antiguos. En los países donde el consumo de pan está extendido, el trigo representa una quinta parte del total de calorías consumidas en la dieta. En su composición cuenta con un gran porcentaje de hidratos de carbono, aunque es pobre en contenido proteico y muy bajo en grasas, aporta fibra, vitaminas sales y minerales. Sin embargo, el trigo sólo, al igual que el resto de los cereales, no es capaz de proveer todos los aminoácidos esenciales necesarios para un apropiado desarrollo, ya que es deficiente en algunos aminoácidos esenciales como lisina. Para mejorar la calidad proteica de la dieta se puede recurrir a la combinación de cereales y leguminosas, ya que ambas proteínas se complementan.

El perfil aminoacídico también puede mejorar con la ingesta de proteínas más completas, como las animales, fundamentalmente las del huevo y la leche. Ciertos componentes del trigo se concentran en el salvado y el germen, por lo que las harinas blancas contienen una proporción menor de estos componentes que las harinas integrales.

Tabla 1: Valores nutricionales de la harina de trigo.

|                         | Harina Blanca | Salvado | Germen | Harina Integral |
|-------------------------|---------------|---------|--------|-----------------|
| Calorías (kcal)         | 361           | 216     | 360    | 339             |
| Proteína (g)            | 11,98         | 15,55   | 23,15  | 13,7            |
| Grasa (g)               | 1,66          | 4,25    | 9,72   | 1,87            |
| Hidratos de Carbono (g) | 72,53         | 64,51   | 51,80  | 72,57           |
| Cenizas (g)             | 0,47          | 5,79    | 4,21   | 1,6             |
| Fibra (g)               | 2,4           | 42,8    | 13,2   | 12,2            |
| Humedad (g)             | 13,36         | 9,9     | 11,12  | 10,26           |
| <i>Minerales</i>        |               |         |        |                 |
| Calcio (mg)             | 15            | 73      | 39     | 34              |
| Hierro (mg)             | 0,9           | 10,57   | 6,26   | 3,88            |
| Magnesio (mg)           | 25            | 611     | 239    | 138             |
| Fósforo (mg)            | 97            | 1013    | 842    | 346             |
| Potasio (mg)            | 100           | 1182    | 892    | 405             |
| Sodio (mg)              | 2             | 2       | 12     | 5               |
| Zinc (mg)               | 0,85          | 7,27    | 12,29  | 2,93            |
| Cobre (mg)              | 0,18          | 1       | 0,8    | 0,38            |
| Manganeso (mg)          | 0,79          | 11,5    | 13,3   | 3,8             |
| Selenio (mcg)           | 39,7          | 77,6    | 79,2   | 70,7            |
| <i>Vitaminas</i>        |               |         |        |                 |
| Tiamina (mg)            | 0,08          | 0,52    | 1,88   | 0,45            |
| Riboflavina (mg)        | 0,06          | 0,58    | 0,37   |                 |

Fuente: (Manuel Gómez Pallarés, 2006).

### 1.3 Gluten

Gómez 2006, define al gluten como un gel formado por las proteínas de almacenamiento del grano de trigo cuando se trabaja mecánicamente una mezcla de harina y agua.

Las proteínas del gluten brindan cualidades únicas de horneado a los productos a base de trigo, concediendo capacidad de retención de humedad, cohesividad, viscosidad y elasticidad en la masa. Las proteínas que integran el gluten se encuentran localizadas en cuerpos proteicos en el endospermo del grano; durante el amasado se produce la ruptura de estos cuerpos y su hidratación, formando una red tridimensional continua en la cual se encuentra embebido el almidón. Las interacciones de tipo covalentes y no covalentes entre los poli péptidos más grandes que forman la masa producen una matriz elástica y extensible. Los elementos estructurales responsables de esta propiedad particular son los puentes disulfuro, interacciones iónicas e hidrofóbicas y

secuencias ricas en glicina (D. Belitz, 1986).

Las proteínas del gluten pueden ser divididas en dos grupos principales según su solubilidad en alcohol, así se designan a las gliadinas como solubles, y a las gluteninas como insolubles.

Las dos constan de compuestos proteicos parcialmente cerrados, con un alto contenido de glutamina y prolina. Las gliadinas son proteínas monoméricas que pueden contener o no enlaces di sulfúricos entre sus cadenas. Las gluteninas contienen enlaces di sulfúricos, que al romperse dan lugar a subcadenas que muestran una solubilidad en alcohol similar a la de las gliadinas.

Cada tipo de proteína del gluten consiste en de dos a tres estructuras diferentes, en las cuales una de ellas contiene secuencias repetitivas únicas ricas en glutamina y prolina. Los enlaces no covalentes son esenciales en la formación y consistencia de las masas (Wieser, 2007).

El uso de las proteínas de gluten, se masificaron no por su valor nutricional, sino por su valor tecnológico, ya que brinda las cualidades de retención de aire dentro de su matriz proteica, fenómeno que permite la panificación y brinda mejor terminado a los productos a base de trigo (Parada, 2010).

### **1.3.1 Acción del gluten en la panificación.**

Durante el amasado las partículas de harina se hidratan lentamente. A su vez y gracias al trabajo mecánico que se aplica durante el proceso, las partículas de gluten interaccionan entre si y dan lugar a la formación de una red tridimensional, lo que se traduce en una masa cohesiva, extensible y con capacidad de retener los gases producidos en la fermentación. El almidón también se integra en la red de gluten, al igual que el resto de componentes de la harina, mientras que los ingredientes solubles, como la sal o el azúcar, permanecen en solución. Cuando se han completado estos procesos debe detenerse el amasado ya que un exceso suele llevar consigo un debilitamiento de la red de gluten, una pérdida de elasticidad de las masas y una menor capacidad de retención de gases.

A la vez que se desarrolla la red de gluten, la masa incorpora aire en forma de

burbujas, las cuales otorgan la esponjosidad del pan. Si el aire incorporado lo hace en forma de burbujas muy pequeñas y uniformemente distribuidas el pan final tendrá un alveolado fino y regular (Manuel Gómez Pallarés, 2006). Por el contrario, si el aire es atrapado en volúmenes mayores, el alveolado final será más grosero e irregular. La aireación de la masa y sus características reológicas dependen de la velocidad de amasado, la presión en el interior de la amasadora y el tipo de harina utilizada. Durante el amasado las enzimas amilolíticas son activadas y actúan sobre los gránulos de almidón (Nyuk Ling Chin, 2005).

Como resultado de la acción enzimática, azúcares fermentables que sumados a los azúcares presentes en la masa forman el sustrato para que las levaduras puedan empezar con metabolismo. La acción de las levaduras transforma los azúcares en alcohol, óxido carbónico y otros compuestos menores que influyen en el aroma final del pan. En un principio el CO<sub>2</sub> formado del metabolismo de la levadura, permanece en solución acuosa dentro de la estructura proteica del gluten, pero a medida que el agua se satura el CO<sub>2</sub> forma e hincha las burbujas de aire formadas durante el amasado. Como resultado de este proceso la masa se expande y cambia sus propiedades físicas, facilitando el laminado y la formación de las piezas.

En los procesos de panificación es habitual realizar una fermentación inicial en la masa, antes del boleado de las piezas, y otra final, con la bola ya formada. La primera otorga características de manejo a la masa, ya que facilita la mecanización y da mejor reología final a cada pieza; estos cambios dependen de la temperatura y el tiempo de amasado (Phimolsiripol, 2003). La segunda fermentación proyecta incrementar el tamaño de las piezas para obtener un producto grande y esponjoso. Es trascendental que la fermentación se desarrolle hasta su punto óptimo, en donde el aumento de volumen no sobrepase ni esté por debajo de las características deseadas. El tiempo necesario para ello dependerá de la dosis de levadura y de la temperatura de fermentación. Cuando la dosis de levadura y la temperatura de fermentación son menores a las óptimas, mayor es la generación de compuestos responsables del aroma final del pan (Zehentbauer y Grosch 1998) y la actuación de las enzimas sobre la masa, lo que se traduce en productos con mayor aroma y vida útil.

Una vez fermentadas las piezas, se introducen en el horno. Durante el horneado

incrementan su volumen, se forma la miga y la corteza y esta última se carameliza guiada por la reacción de Maillard. En la primera fase del horneado destaca el incremento de volumen de las piezas. Esta expansión depende de varios factores: por un lado los gases estancados en el interior de las piezas se expanden al incrementarse la temperatura; por otro, parte del agua y del etanol presentes en las masas se evaporan y aumentan la presión de vapor interna. También se toma en cuenta que las levaduras continúan activas hasta que la masa ha alcanzado los 60°C de temperatura, a la cual los microorganismos se inactivan. A temperaturas de 30- 50 °C las levaduras se encuentran en su pico de actividad, siempre que cuenten con azúcares para llevar a cabo su ruta metabólica, por lo que se producirá una cantidad importante de CO<sub>2</sub> que promueve la expansión de la masa. Cuando la masa alcanza cierta temperatura el almidón inicia su gelatinización, para lo que necesita humedad. A su vez el gluten se deshidrata y sufre reacciones de proteólisis. Estos cambios dan la forma final a la pieza, y encierran la miga final del producto. En el proceso térmico, la masa no suele aumentar su temperatura por encima de los 100°C. Esto por los fenómenos de evaporación de la humedad desde el interior hacia el exterior de la pieza. Al reducirse la cantidad de humedad que llega al exterior, la temperatura de la corteza aumenta y da lugar a la formación de la corteza del pan. El incremento en la temperatura posibilita las reacciones de Maillard entre azúcares y aminoácidos y el consiguiente oscurecimiento de la corteza. A este fenómeno también contribuyen las reacciones de caramelización de los azúcares que se producen a altas temperaturas (G. Zehentbauer, 1998).

Las condiciones de horneado depende de la formulación, del tamaño de las piezas, de su consistencia y del tipo de producto. Generalmente el horneado se da entre los 180 y 235 °C, aunque algunos panes demandan temperaturas cercanas a los 500°C durante tiempos cortos. El tiempo de cocción varía de un tipo de pan a otro, con rangos comprendidos entre 15 y 45 minutos. En general las piezas de mayor tamaño y las más redondeadas requieren menores temperaturas de horneado y tiempos más prolongados, con el objetivo de que la temperatura llegue al punto más interno de la pieza, sin dañar el exterior. Así, aquellas masas más compactas necesitan de menor temperatura y mayor tiempo para que el calor pueda llegar al punto más interno. Otro elemento a considerar para la cocción es la presencia de agua vaporizada en el horno al comienzo de la cocción. Este se condensa en la superficie de las piezas retrasando

el secado de la superficie y ralentizando algunas de las reacciones que se producen en el horneado. Como resultado las piezas de pan exhiben cortezas más finas y crocantes con un aspecto brillante. En general la presencia de vapor influirá en el color de las piezas y permitirá una mayor expansión (David SReid, 2010). En los últimos años se han incrementado las investigaciones sobre el horneado del pan mediante la tecnología de microondas en combinación con la presencia de lámparas halógenas (Zhangli Pan, 2011). Sin embargo estos sistemas de horneado todavía no se utilizan a nivel industrial. Mediante hornos mixtos (microonda/halógenos) se consiguen panes con un volumen específico y un color conforme a los obtenidos mediante sistemas convencionales, aunque la pérdida de peso y la pérdida de estabilidad de los panes son excesivamente altas.

Tras el horneado, las piezas se enfrían para ser envasadas sin que el vapor se condense en el interior del empaque, factor que puede fomentar el crecimiento de microorganismos. Durante el enfriamiento la amilosa pasa un proceso de retrogradación que termina de formar y estabilizar la miga, lo que se traducirá en el corte final del pan (Manuel Gómez Pallarés, 2006).

### **1.3.5 Hidrólisis de gluten por vía fermentativa.**

Durante la fermentación de las llamadas masas ácidas o masas madres ocurre un proceso de hidrólisis y despolimerización de las proteínas del trigo. En las primeras etapas de la fermentación, la glutenina sufre un proceso de despolimerización, donde se transforma de una proteína insoluble en alcohol, a una que se solubiliza en este medio, a medida que el pH disminuye, esta se degrada hasta el punto de quedar ramas péptidas que ya no tiene las mismas funciones que la glutenina (Loponen, 2011).

La capacidad de reducción de los puentes disulfuro en las moléculas de proteína de las masas madres se origina por la actividad del glutatión y su reductasa, donde esta actividad proteolítica origina la mayoría de endopeptidasas en la masa.

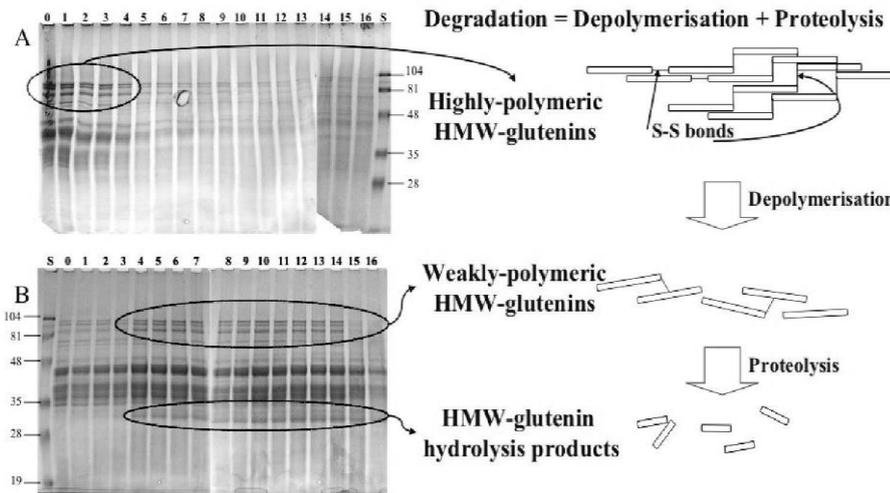


Figura 2: Vía proteolítica de las proteínas del gluten.  
Fuente: Loponen, 2011.

La manera más usada de limitar esta actividad proteolítica son los tratamientos de calor aplicados a los granos, donde las enzimas son inactivadas, deteniendo su acción, contrariamente, en caso de querer aumentar la actividad enzimática, se utiliza la técnica del germinado, o malteado, que incrementa la actividad enzimática, y la degradación de moléculas en el grano.

En este caso la adición de harina de grano malteado a la elaboración de masas madres, beneficia la calidad final del producto, por la cantidad de sustancias que brindan aroma y sabor al pan, provenientes de los aminoácidos liberados en la proteólisis, que actúan como precursores de moléculas volátiles típicos en la fermentación y cocción del pan.

Por otra parte, la hidrólisis extensiva de las prolaminas durante la fermentación de masas madre, pueden reducir la concentración de estructuras prolamínicas inmunogénicas, como la gliadina, pero siempre dejando una cantidad residual, que a pesar de la hidrólisis extensiva, no es apta para ser definida como libre de gluten.

#### 1.4 Intolerancia al gluten

Parada (2010), define la enfermedad como un desorden autoinmune intestinal crónico, con un fuerte componente genético, causado por la ingesta de

productos que contienen gluten en su composición, tales como trigo, cebada, centeno y ciertas variedades de avena. El cuerpo reacciona de manera desfavorable a esta proteína produciendo un proceso inflamatorio crónico en el intestino delgado que conlleva al aplanamiento de las vellosidades intestinales, hiperplasia de las criptas e infiltración del epitelio por linfocitos, que progresivamente pueden tener una transformación maligna. Se tiene entendido que la enfermedad es causada por variaciones genéticas que otorgan la susceptibilidad a los pacientes, sin ser una teoría concluyente, ya que las causas pueden diferir en cada país de estudio, y pueden estar presentes en el sistema inmune de cada persona, con genes específicos que generan permeabilidad en las capas del intestino.

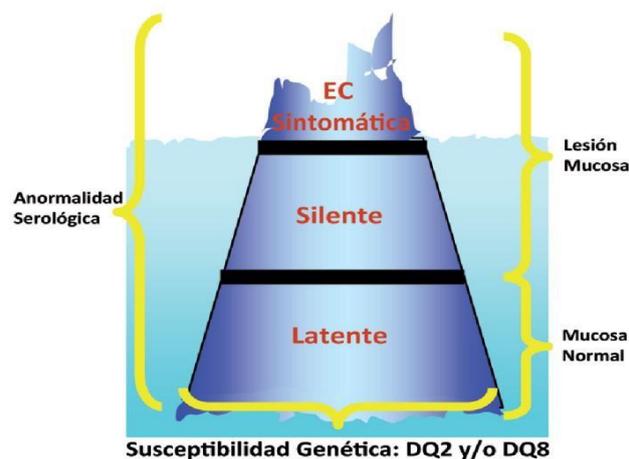


Figura 3: Manifestaciones clínicas de la enfermedad celíaca caracterizada como un Iceberg.

Fuente: (Peña, 2013)

El concepto de iceberg expresa la capacidad de la enfermedad de mostrarse en diferentes maneras, ya sea la enfermedad celíaca sintomática, donde los pacientes mostrarán síntomas, con anticuerpos positivos y que tienen una lesión moderada a grave de la mucosa intestinal; de igual manera existe la zona silente, donde la sintomatología puede ser menor o no presentarse, tiene uno de los dos anticuerpos positivos y una lesión leve en la mucosa. En estos dos grupos la lesión es evidente. La celiaquía latente el paciente es asintomático y sus exámenes son negativos para

los dos anticuerpos y su biopsia intestinal no muestra lesiones o ulceraciones en la mucosa (Luis Rodrigo Peña, 2013).

Un problema muy común dentro de la celiaquía silente es que al ser asintomática puede pasar desapercibida durante largos periodos de tiempo, y muchas veces ser confundida con otros parámetros clínicos.

La prevalencia de la intolerancia al gluten es del 1% del total de la población Norteamericana y europea, mientras en Latinoamérica no existen datos claros de la cantidad de afectados por la patología (Parada, 2010). No existe tratamiento farmacológico para tratar la celiaquía (Lewis, 2015). La eliminación total del gluten de la dieta es la única manera conocida de limitar la enfermedad, la cual requiere de educación de los pacientes y sus familias por parte de médicos y nutricionistas, que puedan guiarlos en la adaptación de una dieta libre de gluten. La adaptación a la dieta no siempre es fácil, por la gran cantidad de productos que tienen gluten en su formulación o composición natural, además de la contaminación cruzada que puede existir en la preparación y manipulación de los alimentos, ya que algunos pacientes pueden resultar afectados incluso por cantidades minúsculas. Estas limitaciones pueden tener consecuencias en la psique del afectado, ya que se vuelven en sujetos relativamente limitados que no perciben mantener una vida normal con relación al resto de personas, lo cual conlleva problemas psicológicos, emocionales y económicos. El caso de que los productos aptos para el consumo por personas con enfermedad celíaca no estén ampliamente diversificados, sus cualidades nutritivas son limitadas llevando a sufrir deficiencias vitamínicas, de calcio, hierro, zinc y fibra; además de ser costosos y tienen una palatabilidad reducida en comparación con sus pares con gluten (Arendt et al.2008).

### **1.5 Microorganismos BAL**

Las bacterias del ácido láctico (BAL), son un amplio grupo de microorganismos que producen ácido láctico como el mayor metabolito a partir de una fermentación de carbohidratos, las cuales pueden dividirse en dos grupos, homofermentativas y heterofermentativas, las primeras produciendo ácido láctico como único producto de la fermentación y las segundas produciendo además metabolitos como dióxido de carbono, alcoholes y/o ácidos orgánicos. Son Gram positivas que no forman esporas,

muy resistentes a los ácidos orgánicos y de reacción negativa ante la catalasa.

### **Homofermentación**



### **Heterofermentación**



Las BAL están muy diversificadas en la naturaleza y son responsables de muchas de las fermentaciones espontáneas que en esta ocurren, además son microorganismos muy comunes en la flora intestinal y mucosas humanas. Los géneros que comprenden las BAL están repartidos entre Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Lactococcus, Streptococcus, Enterococcus, Tetragenococcus, Carnobacterium, Wisella.

Desde tiempos remotos las BAL han sido utilizadas de un modo a posteriori para la producción de productos con fermentaciones deseadas y con una mejora en sus características organolépticas y una acrecentada de su capacidad de preservación en comparación con el producto original. Las principales transformaciones que sufren los productos a raíz de la fermentación láctica son: acidificación por la producción de ácido láctico, que inhibe el crecimiento de organismos que degradan de una manera no deseada el alimento; la producción de bacteriocinas que proveen de una protección adicional contra el crecimiento de microorganismos patógenos; y la producción de ácido láctico y otros metabolitos que aportan en el perfil organoléptico del producto final.

### **1.6 Masas fermentadas con LAB.**

El empleo de masas acidificadas para la elaboración de productos de panificación data de la época neolítica, donde se han descubierto pozuelos que se usaban para la molienda de granos y la posterior elaboración de pan. Sin embargo los egipcios fueron

los primeros en documentar el uso de la masa fermentada para la elaboración de panes leudados. La masa se obtenía usando levaduras silvestres presentes en el ambiente, que fermentaban una mezcla de harina y agua, que se la dejaba reposar por algunos días. Se usaba la masa fermentada en la formulación del pan, y se guardaba una parte para su uso en futuras fermentaciones, así siempre contaban con levaduras listas para la producción. Esta tradición pasó a manos de los griegos, quienes inculcaron estos conocimientos a los romanos, quienes mejoraron el proceso y se encargaron de dispersar por toda Europa. Con el tiempo las formulaciones fueron variando y nacieron los diversos tipos de panes, cada país teniendo su grupo característico.

El uso de las masas acidificadas fue decayendo en los últimos tiempos al industrializarse el proceso de panificación, ya que los productores necesitaban mayores cantidades en menores tiempos, dando nacimiento al cultivo de levaduras específicas que aceleran el proceso de leudado y reducen los tiempos de producción.

Sin embargo los panes hechos con masas acidificadas han tenido un despunte en las últimas décadas, ya sea por su fácil digestibilidad, o por la nueva moda de consumo de productos bajos o libres de gluten.

La importancia del uso de masas acidificadas en la panificación viene de las propiedades que podemos obtener de este método, ya que está demostrado que puede aumentar la calidad del producto final, además del aumento de vida de anaquel, ya que limita el crecimiento de bacterias que dañan la estructura de la miga, además aumenta el volumen de la masa final y retrasa el endurecimiento de la miga. En suma de estas propiedades las masas ácidas dan un mejor sabor y mejora el aporte nutricional al bajar los índices glicémicos (Thiele et al, 2004).

La acidificación de dicho tipo de masas se da por bacterias ácido lácticas presentes en la harina y el salvado. Las más comunes que podemos encontrar son *lactobacillus sanfranciscensis* y *lactobacillus plantarum* además de levaduras propias de los granos.

Las bacterias ácido lácticas son capaces de producir una gran variedad de compuestos con actividad antimicrobiana, entre estos ácidos orgánicos como los ácidos láctico y acético, que son los responsables de la caída de pH, y otros metabolitos como

peróxido de hidrógeno, ácido fórmico ácido propiónico, acetonas y di acetilos. (Magnusson, 2003).

En suma de la producción de metabolitos, se ha demostrado que las bacterias ácido lácticas son capaces de proteolizar las proteínas de las masas fermentadas. Durante la fermentación las subunidades de glutenina de la masa se hidrolizan en péptidos de menor peso molecular afectando a la estructura de macro polímeros del gluten, las proteínas sufren transformaciones aumentando la cantidad de moléculas solubles en alcohol.

La despolimerización de las proteínas de la masa nos da una vía por la cual podemos cambiar la estructura proteica de la gliadina, al ser la que contiene el elemento tóxico que desencadena la enfermedad celiaca podemos reducir su actividad biológica y la cantidad del péptido de 33 moléculas reconocido como el causante del atrofiamento de los vellos intestinales. Al ser reducido nos da una vía por la cual podemos desarrollar productos con menor contenido de componentes tóxicos, mayor digestibilidad pero manteniendo las características que el gluten ofrece en la panificación.

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Microorganismos y medio de cultivo

Para los experimentos se usó una cepa de bacteria láctica *Lactobacillus plantarum*, aislada de un mix *LYOFAST LPR*A de la casa comercial *SACCO* que además contenía *Lactobacillus rhamnosus*, ambas cepas fueron activadas en alícuotas de leche esterilizada, y activadas a 37°C por 72 horas, en condiciones anaerobias para su identificación, y posterior separación.



Figura 4: Sobre Lyofast LPR A (Lactobacillus plantarum; Lactobacillus rhamnosus)

Bajo el microscopio se logró identificar el crecimiento de las bacterias, por el método de tinción de Gram y se las identificó por su taxonomía, las bacterias del género *Lactobacillus plantarum* caracterizadas por ser atachadas y cortas, a diferencia de las del género *Lactobacillus rhamnosus*, que son alargadas.

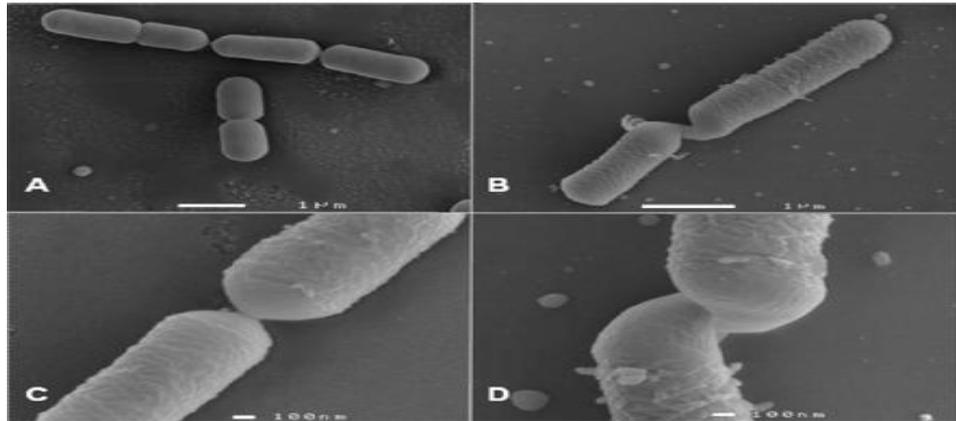


Figura 5: *L. plantarum*  
Fuente: AEM, 2016.

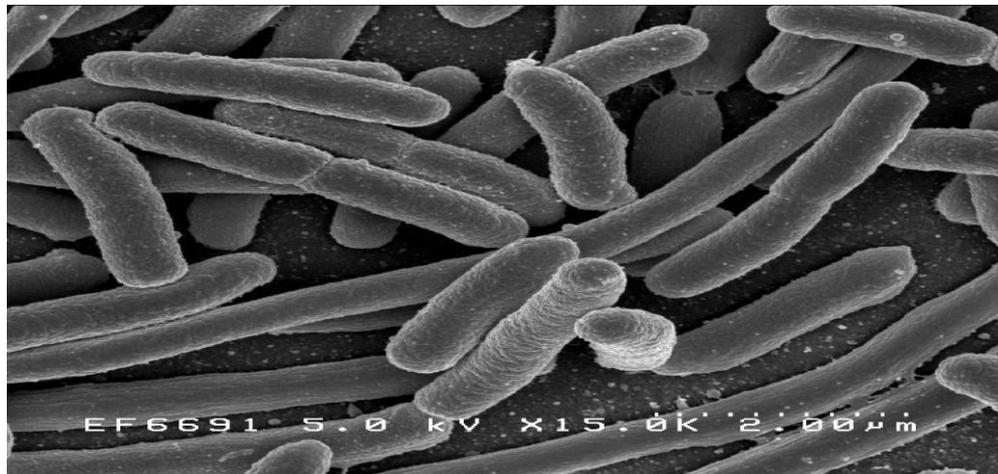


Figura 6: *L. rhamnosus*  
Fuente: Medical News Digest, 2014.

### 2.3 Sustrato

Leche: la leche procedente de una envasadora local, con un contenido graso del 3% p/v, se esterilizó en una autoclave marca “TUTTNAUER” a 121°C por 15 minutos.

Sustrato Agar MRS: se preparó una solución de Agar MRS correspondiente a una concentración del 7% p/p, en agua desmineralizada. La solución se esterilizó en la misma autoclave a 121 ° C por 15 minutos.

Sustrato Agar MRS específico: el sustrato fue especificado para las condiciones

óptimas de crecimiento de la cepa *Lactobacillus plantarum*. El pH del sustrato se ajustó a 4.5, con el objetivo de limitar el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus*, y obtener un sustrato con predominancia de *Lactobacillus plantarum*

#### 2.4 Propiedades fisicoquímicas

Se determinaron pruebas de pH, con un potenciómetro marca METTLER TOLEDO de sólidos solubles, repitiendo cada valoración dos veces. Se maceró 10 g de pan en 100mL de agua des ionizada durante 30 minutos, y luego se tomó la lectura con el potenciómetro.

#### 2.5 Recuento en placa (UFC/ml)

Se realizaron diluciones sucesivas hasta  $10^8$  con agua peptonada (0.1% p/v) de las muestras inoculadas en proporción 1:9, luego se aplicó el método de siembra en profundidad con agar MRS y las cajas se incubaron a 37°C, por 72 h en condiciones de anaerobiosis. El conteo de células viables se realizó como UFC/100 g, y el resultado se expresó en unidades logarítmicas (Log UFC/100 g). El recuento para cada sustrato en los tiempos de control se realizó por triplicado.



Figura 7: Diluciones y siembra de bacterias.

## 2.6 Microscopía

El análisis fisiológico de las bacterias se llevó a cabo en un microscopio marca OLYMPUS, modelo LED220. Las muestras de las alícuotas inoculadas de leche fueron sembradas en placas de vidrio, secadas y teñidas por el método de tinción de Gram, para posteriormente ser analizadas y clasificadas.

Se identificaron las dos bacterias que crecieron en el medio, y se las clasificó por su fisiología, según los parámetros que presenta cada una, por el pH que otorgamos al medio, pudimos observar que las bacterias del género *Lactobacillus plantarum* crecieron en una proporción mucho mayor a las del género *Lactobacillus rhamnosus* que crecieron pocas colonias aisladas unas de otras y en número muy reducido, comparadas a las primeras.



Figura 8: Diferenciación de cepas por observación en microscopio con método de tinción de Gram.

## 2.7 Aislamiento de bacterias

### 2.7.1 Siembra.

Posteriormente a la identificación, se procedió a sembrar las colonias identificadas como *Lactobacillus plantarum* en caldo de cultivo MRS a pH 4, por 72 h a 37°C, con el fin de obtener la mayor cantidad de UFC posibles.

Con la inoculación en el caldo con el pH específico se logró obtener una solución con altas concentraciones de UFC de la bacteria deseada, además de limitar el crecimiento de la cepa de lactobacillus de género rhamnosus. Al final se obtuvo un caldo de cultivo, el cual estaba listo para inocular en alícuotas de leche estéril.



Figura 9: Crecimiento de colonias de *L. plantarum* en agar MRS

### 2.7.2 Inoculación

Una vez obtenidas las bacterias deseadas, se inocularon en leche esterilizada 114°C por 15 minutos. Las bacterias crecieron en la leche durante 92h a 37°C de temperatura, donde se obtuvo un crecimiento exponencial de las colonias.

### 2.7.3 Operaciones unitarias

El amasado es una de las partes fundamentales en la panificación, ya que este proceso mezcla de manera homogénea la harina con el agua y los demás ingredientes de la fórmula, logra que las proteínas del gluten se hidraten mientras se estiran, proceso que permite atrapar agua, aire y CO<sub>2</sub> en la estructura proteica de la masa. El

amasado brinda elasticidad y flexibilidad a la masa y es el responsable de crear la estructura del pan que logre aguantar la tensión creada por la expansión del gas dentro de la masa durante el horneado. Durante el amasado se hidratan las partículas de almidón y de gluten, las moléculas de gluten se asocian en fibras y aprisionan el almidón en la estructura proteica que forma. Es preciso que la harina contenga al menos un 7% de gluten para poder envolver en la masa todos los gránulos de almidón. Este proceso requiere un esfuerzo prolongado y enérgico, que sea capaz de estirar las proteínas a su máximo potencial, tomando en cuenta que durante el leudado las proteínas sufren un proceso de proteólisis que aumenta el cambio de la estructura proteica, esto permite obtener un mayor rendimiento en volumen en la presentación final del producto.

Para esta operación se utilizó un método directo de amasado, donde juntamos todos los componentes de la masa en un recipiente, y se le aplicó una fuerza intensa usando una amasadora casera marca (Kitchen Aid), durante 10 minutos, hasta que se obtuvo una masa muy elástica.

#### **2.7.4 Leudado**

El proceso de leudado se divide en dos partes. El leudado inicial, que empieza mientras se amasa la harina con la levadura y el resto de componentes. La levadura empieza a consumir azúcares, formar anhídrido carbónico y alcohol desde el momento que es introducida a la mezcla. Posterior al amasado la masa se deja reposar en un lugar caliente y húmedo, con el objetivo de que la levadura tenga las condiciones óptimas de reproducción. En esta etapa se busca que las levaduras produzcan los metabolitos que otorgarán sabor y aroma al pan, tales como alcoholes y ácidos orgánicos, además de compuestos volátiles. Los ácidos orgánicos además de brindar sabor y aroma, se adhieren al gluten y lo proveen de tenacidad que ayudará a la impermeabilización de la masa, ya que contraen la proteína. El leudado inicial toma de 10 a 40 minutos, según el tipo de pan, y las características finales deseadas, y finaliza el momento de realizar el ovillado o boleado.

El segundo leudado inicia luego del boleado, donde se encierra toda la miga y se otorga un acabado liso en el exterior de la pieza para que se impida la salida de gas. Una vez se le otorga la forma deseada a la masa, se la lleva nuevamente a las

condiciones de humedad y temperatura óptimas para que la levadura continúe con la degradación de los azúcares, pero en esta ocasión el objetivo primordial es la producción de CO<sub>2</sub>, el cual queda atrapado en forma de burbujas en la estructura formada por el gluten, este fenómeno se lo conoce como retención gaseosa. Durante esta etapa la pieza de pan se hinchará hasta su volumen final, y obtendrá la maduración necesaria antes de ser horneado, este proceso dura entre 25 y 50 minutos. La masa que se obtuvo durante el amasado fue trasladada a una lata enharinada, y se la cubrió de un lienzo húmedo, se la introdujo en la cámara de leudado durante 40 minutos a una temperatura de 40°C y una humedad del 95% para el leudado inicial. Al final de los 40 minutos la masa había duplicado su volumen, indicando que estaba lista para el boleado. Se dividió la masa en porciones de 70g y fueron boleadas hasta obtener formas esféricas, una parte se las enrolló para obtener bollos alargados. Las piezas se las ubicó en una lata enharinada y separando cada una para que tengan espacio para expandirse

El segundo leudado se realizó en la misma cámara a las mismas condiciones durante 40 minutos, al final del leudado se obtuvieron piezas redondas y alargadas con un volumen duplicado en comparación al inicial.

### **2.7.5 Horneado**

El objetivo del horneado es cocer la masa, reducir la actividad de agua, crear la corteza que envolverá a la miga, inactivar levaduras y enzimas, y darle el terminado a la pieza de pan. El horneado se llevó a cabo en un horno de convección forzada. Los parámetros fueron:  $T^{\circ}= 180^{\circ}\text{C}$  y  $t=18$  minutos.

### **2.8 Masas madre**

La masa madre ha sido utilizada en la panificación desde tiempos muy antiguos. Esta aporta con micro flora y ácidos orgánicos que favorecerán a la masa en la panificación.

El proceso de elaboración de masas madre requiere de un control de las características, además de los tiempos de elaboración, razón por la cual ha sido sustituida por diferentes mejoradores y mayores concentraciones de levadura

prensada, sin importar la baja de calidad en el pan.

La masa madre se elabora mezclando cantidades exactas de harina de trigo y agua pura. A una temperatura adecuada las bacterias presentes en el grano de trigo fermentarán los almidones y degradarán la proteína. Las bacterias silvestres que inician la fermentación producen ácido láctico y ácido acético aumentando la acidez de la masa y las levaduras forman CO<sub>2</sub> y metabolitos. La mezcla de la micro flora formará un lacto fermento que no necesita de levadura adicionada, ya que tendrá la capacidad de aportar con el número de levaduras necesario para fermentar mayores cantidades de masa, con la diferencia de que el tiempo de leudado aumentará al ser microorganismos silvestres que no están acondicionados para fermentar velozmente. El tiempo de reposo que se necesita para tener una masa viable es de tres a cuatro días. Dado que la fermentación se da por microorganismos silvestres, como diversas cepas de lactobacillus y varias levaduras, no podemos controlar el proceso y la cantidad de bacterias de cada cepa que crece en el lacto fermento (Delgado et al, 2012).

Con el objetivo de obtener un lacto fermento con una cantidad elevada de bacterias del genero lactobacillus plantarum, se elaboró una masa madre con una leche inoculada con dicha bacteria en una cantidad de  $448 \cdot 10^5$  UFC/ml<sup>3</sup>, mezclada con harina de trigo en proporción peso-peso de 1:1, garantizando de esta manera que la bacteria que guió la fermentación fue la de nuestro interés. La fermentación se dió a una temperatura de 37°C durante 96 horas, hasta obtener una masa líquida muy viscosa, de gran aroma y lista para ser usada en producción.

## **2.9 Propiedades físicas otorgadas al gluten**

Como revisamos anteriormente, el gluten se desarrolla mediante fuerzas aplicadas a este, formando una red proteica que atrapa almidón y agua, elastizándose y dando cohesividad a la masa. Estos atributos son muy apreciados en la panificación, pero no son buscados en la elaboración de otros productos como galletas, pasteles o productos de repostería. Con este criterio, se quiso analizar si el desarrollo del gluten en la masa, facilita o dificulta la degradación del mismo, con lo cual se analizó la degradación de la gliadina en dos casos, en una masa madre con un gluten desarrollado, y otra en la cual no se le aplicó ninguna fuerza mecánica.

## 2.10 Amasado intenso.

Se mezcló harina y la leche inoculada con *Lactobacillus plantarum* en una proporción 1:1, se le aplicó un batido intenso durante 10 minutos, con la finalidad de que el gluten se desarrolle, elasticice y atrape el líquido en su estructura, posiblemente dando una mayor área de exposición de sus moléculas a la degradación por la bacteria. Se bate hasta lograr una masa viscosa, y se colocó en una incubadora durante 96 horas a una temperatura constante de 36°C, esto con el objetivo de que las bacterias degraden el gluten, reduciendo la cantidad presente de gliadina.

### 2.10.1 Mezcla doligero.

Se mezcló harina y la leche inoculada con *Lactobacillus plantarum* en una proporción 1:1, pero con la diferencia de que a esta no se le aplicó una fuerza mecánica, sino simplemente se dejó a la harina hidratarse en la leche inoculada. Al no existir un batido o amasado el gluten no se desarrolló, y su estructura se mantuvo intacta, sin expandirse y sin formar red proteica. Se colocó en una incubadora marca “LAB INCUBATOR” durante 96 horas a una temperatura constante de 36°C, esto con el objetivo de que las bacterias degraden el gluten, reduciendo la cantidad presente de gliadina.

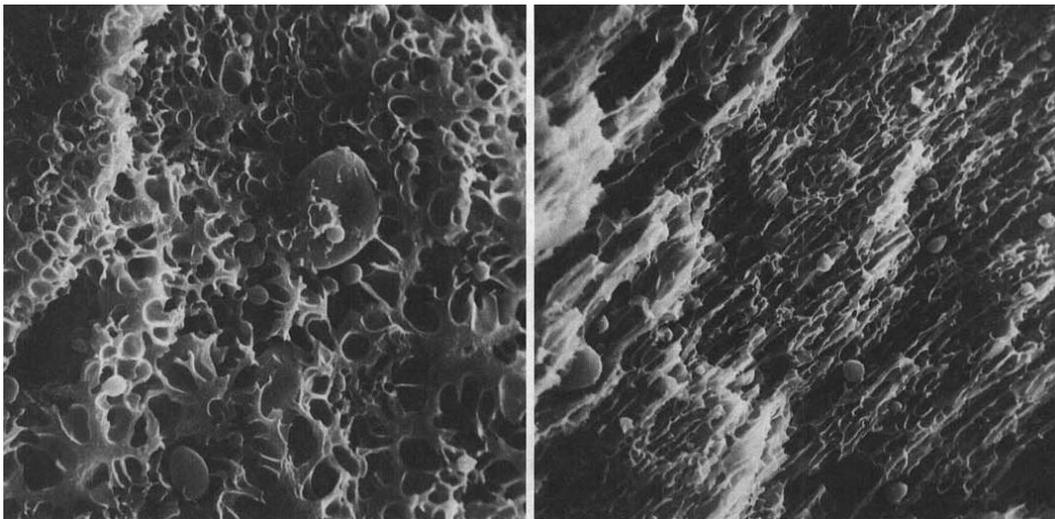


Figura 10: Estructura de gluten en modo de relajación y en modo extendido.

Fuente: (D. Belitz, 1986)

### 2.10.2 Formulación de masa para pan

Se formuló dos masas, las cuales diferían en el agregado de masa fermentada por bacterias lácticas, a las cuales se las denominó como “O” Y “S”. Se denominó “O” a los panes que fueron elaborados sin la adición de lacto fermento, y se los considera como un producto con la cantidad de gliadina intacta; Se denominó “S” al producto que se elaboró con la adición de un 64.24% de lacto fermento de harina de trigo inoculado con *Lactobacillus plantarum*, el cual se considera como el producto reducido en gliadina.

Ambas elaboraciones cuentan con la misma cantidad en peso de cada insumo, incluyendo harina de trigo, con el objetivo de tener una formulación con la misma proporción de gliadina inicial. A las dos se las brindo el mismo tratamiento, con la diferencia de que la formulación S contiene masa inoculada y fermentada durante 5 días.

**Tabla 2: Formulación de panes S y O.**

| <b>O</b> |                 | <b>FORMULACIÓN</b> | <b>S</b>        |          |
|----------|-----------------|--------------------|-----------------|----------|
| <b>%</b> | <b>PESO (g)</b> | <b>INSUMO</b>      | <b>PESO (g)</b> | <b>%</b> |
| 100      | 408             | Harina             | 308             | 100      |
| 12,25    | 50              | Azúcar             | 50              | 16,23    |
| 2,08     | 8,5             | Sal                | 8,5             | 2,76     |
| 1,47     | 6               | Levadura           | 6               | 1,95     |
| 33,33    | 136             | H2O                | 36              | 11,69    |
| 10,42    | 42,5            | Miel               | 42,5            | 13,80    |
| 24,51    | 100             | Papa liofilizada   | 100             | 32,47    |
| 26,23    | 107             | Mantequilla        | 107             | 34,74    |
| 12,25    | 50              | Huevo              | 50              | 16,23    |
| 7,35     | 30              | Leche en polvo     | 30              | 9,74     |
| -        | -               | Masa inoculada.    | 200             | 64,94    |
|          | <b>938</b>      | <b>MASA TOTAL.</b> | <b>938</b>      |          |

## 2.11 Análisis ELISA

Consiste de un ensayo por inmune absorción ligado a enzimas, donde se analizan e identifican antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de manera tal que los conjugados resultantes adquieren acción inmunológica y enzimática. Se produce una reacción antígeno-anticuerpo, la cual queda inmovilizada. A esta reacción se la revela utilizando un sustrato específico que al actuar en la enzima produce un coloramiento observable a simple vista, y cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro.

### 2.11.1 Preparación y extracción de la muestra.

1. Preparar una solución de etanol con concentración de 40%.
2. Agregar 1g de la muestra pulverizada en un tubo limpio de 50mL.
3. Agregar 1 cucharada de aditivo de extracción al tubo.
4. Agregar 10ml de etanol al 40% al tubo, taparlo firmemente, y agitar el tubo vigorosamente durante 20 segundos para garantizar una mezcla completa.
5. Extraer agitando a 150 rpm en un rotador, poniendo el tubo de lado en la almohadilla del instrumento y sosteniéndolo firmemente con un caucho o cinta, rotar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Retirar el tubo y dejarlo descansar en un estante por 10 minutos para que la muestra se estabilice antes de retirar el extracto transparente.
7. Diluir cada muestra en una proporción de 1:40; extraer 100 $\mu$ L de la porción superior del extracto y trasfiera a un tubo o ampolla que contenga 3.9ml de Tampón Fosfato Salino, o mezcle 0.5ml del extracto con 19.5ml de Tampón Fosfato Salino en un tubo de ensayo.
8. Para mezclar agite el tubo por 5 segundos.

Analizar las muestras diluidas dentro de las 2-3 horas de la extracción.

### 2.11.2 Procedimiento:

Dejar que el kit de prueba y todos los reactivos se entibien a temperatura ambiente antes de ser utilizados:

1. Separar un micro pocillo por cada muestra que se vaya a analizar, además de un micro pocillo marcado en rojo para los controles, y colocarlos en el estante para micropocillos.
2. Retirar el mismo número de micro pocillos cubiertos con anticuerpos. Retornar los micro pocillos que no se van a usar a la bolsa de aluminio con el paquete desecante inmediatamente. Sellar la bolsa para proteger los anticuerpos. Marcar el extremo de la tira con un "1", y poner la tira en el estante para micro pocillos con el extremo que está marcado hacia el lado izquierdo.
3. Mezclar cada reactivo agitando cada botella antes del uso.
4. Usando la punta de una pipeta nueva para cada uno de los micro pocillos, transfiera 150µL de los controles y extractos de muestra a los micro pocillos de transferencia marcados en rojo según se indica en la plantilla a continuación. Solo trabaje con 12 tiras de pocillos a la vez.

|    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0  | 5  | 10  | 20  | 50  | s1  | s2  | s3  | s4  | s5  | s6  | s7  |
| s8 | s9 | s10 | s11 | s12 | s13 | s14 | s15 | s16 | s17 | s18 | s19 |

5. Usando la pipeta de 12 canales y puntas nuevas transfiera 100µL del conjugado a todos los pocillos y mezcle durante 20 segundos deslizando el estante para todos los micro pocillos de atrás hacia adelante en una superficie plana.
6. Incube los micro pocillos por 10 minutos a temperatura ambiente. Deseche los micro pocillos de transferencia marcados en rojo.
7. Agite los micro pocillos para expulsar su contenido. Con una piseta llena de tampón para el lavado, llene cada micro pocillo y agite para expulsar su contenido. Repita este paso 5 veces. Elimine el exceso

de tampón para lavado invirtiendo los pocillos y golpeándolos vigorosamente sobre una toalla absorbente.

8. Agregue el volumen requerido del conjugado de la botella marcada con una etiqueta azul a un bote de reactivos limpio.
9. Usando la pipeta de 12 canales y puntas nuevas transfiera 100  $\mu\text{L}$  del conjugado a todos los micro pocillos y mezcle durante 20 segundos deslizando el estante para los micro pocillos de atrás hacia adelante en una superficie plana.
10. Incube los micro pocillos por 10 minutos a temperatura ambiental.
11. Lave todos los micros pocillos con el tampón para el lavado tal y como el paso N7.
12. Agregue el volumen requerido de la solución en la botella marcada con una etiqueta verde a un bote de reactivos limpio.
13. Usando la pipeta de 12 canales y puntas nuevas transfiera 100  $\mu\text{L}$  del conjugado a todos los micro pocillos y mezcle durante 20 segundos deslizando el estante para los micro pocillos de atrás hacia adelante en una superficie plana. no expulse las puntas.
14. Incube por 10 minutos a temperatura ambiental.
15. Agregue el volumen requerido de la solución RED STOP en la botella marcada con una etiqueta roja a un balde de reactivos limpio.
16. Con las mismas puntas que fueron usadas para dispensar el sustrato, transfiera 100  $\mu\text{L}$  de RED STOP a todos los micros pocillos y mezcle por 20 segundos.
17. Pase un paño por la superficie inferior y lea el lector de micro pocillos con un filtro de 650nm.
18. Interprete los resultados de la prueba utilizando el lector de micro

pocillos para tiras equivalentes.

### **2.11.3 Interpretación de los resultados**

Los controles estándar fueron realizados para gliadina de trigo, y calculados como gliadina. Aproximadamente el 50% del gluten es disponible como gliadina, por lo que si se deseara calcular el gluten total se debe multiplicar el ppm final por 2.

#### **Límite de cuantificación**

5ppm

#### **Rango de cuantificación**

5-50ppm

### **2.12 Determinación de vida útil**

El momento el que el pan sale del horno, este se encuentra libre de microorganismos debido a la temperatura de cocción, pero al bajar la temperatura se convierte en un medio ideal para la reproducción de hongos y levaduras silvestres, provenientes del medio ambiente, tales como cepas de *Aspergillus*, *Penicillium glaucum*, *Mucor mecedo* y *Rhizopusque* (Salgado, 2012).

La contaminación del pan con estas cepas de hongos afectan sus características organolépticas, modificando su aroma, textura y sabor, además lo hacen incomedible por la aflatoxina producida por los hongos del genero *Aspergillus*, que ha sido demostrado ser un cancerígeno potencial (Quaglia, 1991). La alteración visco elástica que sufre el pan durante su almacenamiento, se cree es causada por la presencia de *Bacillus mesentericus*. Para retrasar el crecimiento microbiano en el pan, generalmente se adiciona propionatos de sodio y calcio (Erich Lück, 2000).

Entonces se realizaron dos tipos de análisis para determinar la vida útil del producto elaborado. Se empezó por tomar muestras para realizar un análisis microbiológico, exactamente de mohos y levaduras, para determinar la carga microbiana del pan a lo largo del tiempo, y un análisis de características organolépticas, con esto

determinamos la aceptación y la capacidad de perdurar aceptablemente en el tiempo.

## **2.13 Análisis realizados.**

### **2.13.1 Sensoriales**

La evaluación sensorial de los alimentos es una función primordial del ser humano, desde temprana edad, basándose en esta para la aceptación o rechazo de los productos a consumir. Esta evaluación se sustenta en criterios que inciden sobre la percepción de las personas acerca de un producto, las cuales determinan la calidad sensorial del mismo. La determinación de cada criterio se lleva a cabo mediante disciplina científica aplicada al análisis sensorial, usando como instrumento a personas denominadas como sujetos de catación, a los cuales se les permite calificar una muestra según características percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído.

Para el análisis sensorial se formó un panel de 10 catadores por cada sesión de cata, la cual se realizó a las 12h, 60h, 84h y 156h luego de la elaboración del producto, el análisis se dio en dos fases, la primera con el producto expuesto a una temperatura ambiente de 25°C y una humedad relativa del 55% en una cámara de simulación de ambiente. La segunda fase se realizó en el mismo tiempo para las sesiones de cata, pero el ambiente al que fue expuesto el producto fue de 30°C y una humedad relativa del 70%, para simular condiciones de ambiente de la costa.

La ficha de cata contó con 6 aspectos a calificar, incluyendo Aroma, Apariencia, Textura, Sabor, Miga, Color, con calificaciones que se expresaban en: MUY BUENO, BUENO, NORMAL, MALO, MUY MALO. A estas calificaciones se les otorgó valoraciones numéricas de 10, 8, 6, 4, 2 respectivamente.

La cata se efectuó de los dos tipos de pan, el uno fermentado con *Lactobacillus plantarum*, y el segundo sin la fermentación. Se los denominó como muestra S y O respectivamente. Posterior a la cata, se recopilaron los datos, se les otorgó su valoración y se determinó la calificación obtenida para cada muestra.

## 2.13.2 Microbiológicos

### 2.13.2.1 Hongos y levaduras

El estudio de mohos y levaduras es importante por la acción nociva que pueden tener en los alimentos malogrando materias primas y productos de manufactura, tal es el caso del pan. Las levaduras pueden ser beneficiosas en la elaboración del pan como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* que metaboliza azúcares, produce etanol y dióxido de carbono como productos de desecho. Este proceso se denomina fermentación, las mismas que en el proceso de horneado serán eliminadas (Totorá, 2007).

Los hongos son multicelulares, filamentosos y con un micelio verdadero, siendo detectables en los alimentos por su aspecto aterciopelado. Las levaduras crecen en medios sólidos similares a las colonias bacterianas. La temperatura de mohos y levaduras óptima se encuentra alrededor de los 25 a 30°C, pero algunos son termófilos y otros psicrótrofos. Casi todos los mohos son capaces de crecer dentro de un amplio intervalo de pH (pH comprendido entre 2 y 8.5), la mayoría crece mejor a pH ácido, siendo el rango óptimo de crecimiento entre 5.5 y 7.5 (Camacho A, 2009). La contaminación por mohos y levaduras en los alimentos se puede dar por diversos factores como pH, Eh, aw, Hr, temperatura, elementos nutritivos, etc. Esta contaminación fúngica puede producir gran variedad de micotoxinas, provocando infecciones y reacciones alérgicas (Rosario Pascual, 2000).

Se hicieron diluciones sucesivas hasta  $10^{-3}$  con agua peptonada (0.1% p/v) de las muestras inoculadas en proporción 1:9, se dejó reposar durante una hora, antes de diluir hasta  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  respectivamente, luego se aplicó el método de siembra directa en placas compact dry, colocando 1ml de cada dilución en cajas para hongos y levaduras. Las cajas se incubaron a 37°C, por 72 h en condiciones normales. El conteo de células viables se realizó como UFC/100g UF y el resultado se expresó en unidades logarítmicas (LogUFC/100 gUF). El recuento para cada sustrato en los tiempos de control se realizó por duplicado.

## **2.14 Determinación de vida útil mediante software STATGRAPHICS**

### **Centurión.**

Statgraphics es un paquete estadístico que desarrolla funciones estadísticas básicas y avanzadas. Es un software que fue creado en 1980 en la Universidad de Princeton. Su actual versión fue desarrollada en el año 2014. El programa es usado para procesos de cálculo SIX SIGMA el cual permite sus aplicaciones en áreas de salud y alimentarias.

La plataforma del programa ressemble a la interfaz de MICROSOFT EXCEL, y permite ingresar datos analíticos en celdas individuales para su posterior análisis.

En el caso de la presente investigación se unificó los datos del crecimiento microbiano, con el desarrollo de las características de textura para cada tipo de pan en un rango de tiempo de hasta 12 días, aplicadas a 15 muestras, en el cual según los datos anteriores se determinaba si sus condiciones eran aptas o no para el expendio y consumo. Estas características particulares de cada tipo de pan le otorgaban una valoración de 1 en caso de ser aceptable, y 0 en caso de no ser aceptable.

Basándose en los parámetros de aceptación o rechazo de una muestra, el software realiza un análisis estadístico de valores críticos y determina los valores donde el producto está en el umbral de su vida útil, y otorga un valor expresado en la unidad de tiempo en la cual los datos fueron ingresados, el cual representará la pérdida de estabilidad del producto y por ende su tiempo de vida útil.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

#### 3.1 DETERMINACIÓN DE VIDA ÚTIL

##### 3.1.2 Aceptación sensorial.

En el estudio se analizaron las diferencias entre el pan elaborado comúnmente, sin la fermentación láctica, y un segundo pan fermentado por bacterias lácticas, con la finalidad de determinar si sufrió algún cambio perceptible por los catadores entre un pan y otro.

Luego de evaluar las fichas de catación, se pudo determinar que cada atributo difirió de su contraparte de diferentes maneras. Tendremos en cuenta que las muestras se dividen de dos maneras diferentes; la primera se diferencia por las condiciones a las que fueron sometidas, donde se denominará condicione de Sierra a la muestra sometida a C y 55% de humedad; y (condiciones de costa) a las muestras sometidas a 30°C y 70% de humedad. Además las diferenciaremos como muestras (S) y (O) a los ejemplares que tuvieron y carecieron de fermentación láctica respectivamente.

##### 3.1.3 Aroma

Se determinó que el aroma se desarrolló positivamente en el pan (O) a lo largo del tiempo, al contrario que las muestras (S), el cual su aroma se desarrolló negativamente, esto para las muestras expuestas a condiciones sierra, siendo la primera muestra la mayormente aceptada por el grupo de catación, mas no así para la muestra expuestas a (condiciones costa), donde a pesar de que los datos demostraron que el aroma disminuyo aceptación de las muestras (S), estas mantuvieron un mejor percepción al olfato al final del tiempo estimado que las muestras (O)

Tabla 3: Tabla de calificación de desarrollo con relación al tiempo de aroma en catas de pan (S y O)

| 25° 55%HR  |          |            |          | 30° 70%HR  |          |            |          |
|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|
| O          |          | S          |          | O          |          | S          |          |
| AROMA      |          | AROMA      |          | AROMA      |          | AROMA      |          |
| Tiempo (h) | $\alpha$ |
| 12         | 36       | 12         | 42       | 12         | 34       | 12         | 42       |
| 60         | 38       | 60         | 42       | 60         | 34       | 60         | 40       |
| 84         | 40       | 84         | 36       | 84         | 40       | 84         | 36       |
| 156        | 40       | 156        | 38       | 156        | 26       | 156        | 38       |

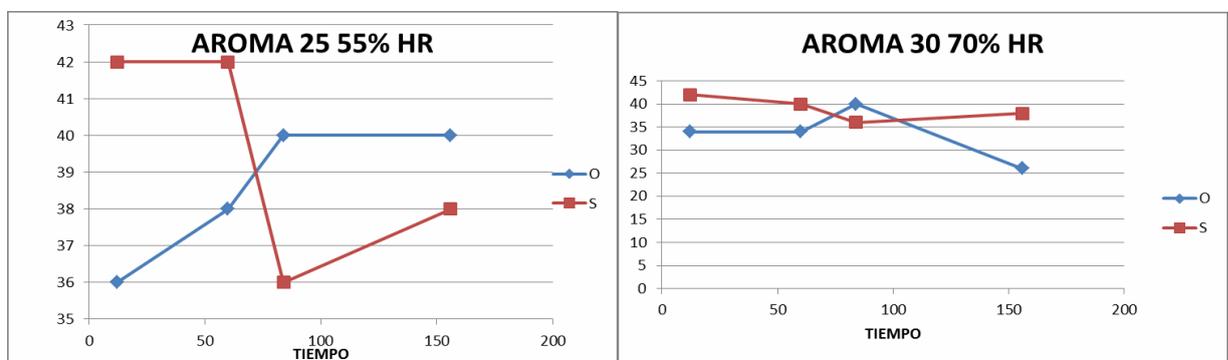


Figura 11: Comparación del desarrollo de aroma con relación al tiempo entre las muestras S y O para condiciones ambientales Costa y Sierra.

### 3.1.4 Apariencia

En lo que respecta a apariencia, cuando se mantuvo en condiciones sierra, no hubo gran diferencia entre las muestras O Y S manteniendo una apariencia estable a lo largo del tiempo. A contrario cuando se lo sometió a condiciones costa, los panes(S) mantuvieron mejor presentación que los (O).

Tabla 4: Tabla de calificación de desarrollo de apariencia con relación al tiempo en catas de pan (S y O)

| 25° 55%HR  |          |            |          | 30° 70%HR  |          |            |          |
|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|
| O          |          | S          |          | O          |          | S          |          |
| APARIENCIA |          | APARIENCIA |          | APARIENCIA |          | APARIENCIA |          |
| Tiempo (h) | $\alpha$ |
| 12         | 32       | 12         | 36       | 12         | 40       | 12         | 36       |
| 60         | 44       | 60         | 44       | 60         | 40       | 60         | 42       |
| 84         | 36       | 84         | 54       | 84         | 38       | 84         | 40       |
| 156        | 30       | 156        | 32       | 156        | 24       | 156        | 32       |

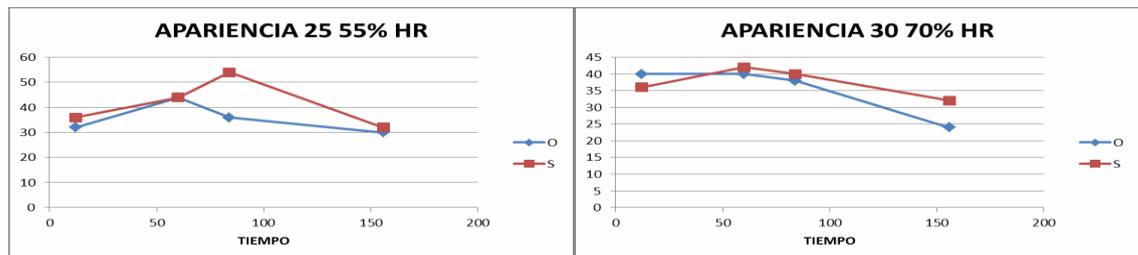


Figura 12: Comparación del desarrollo de la apariencia con relación al tiempo entre las muestras S y O para condiciones ambientales Costa y Sierra.

### 3.1.5 Textura

La textura del producto, fue uno de los aspectos más importantes analizados, y donde se encontró la mayor diferencia entre los dos tipos de panes elaborados. La diferencia fue amplia en las dos condiciones aplicadas, siendo más evidente en la condición costa, donde la textura del producto (O) fue significativamente menos apetecida que la textura del producto (S)

Tabla 5: Tabla de calificación de desarrollo de textura con relación al tiempo en catas de pan (S y O)

| 25° 55%HR  |          |            |          | 30° 70%HR  |          |            |          |
|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|
| O          |          | S          |          | O          |          | S          |          |
| TEXTURA    |          | TEXTURA    |          | TEXTURA    |          | TEXTURA    |          |
| Tiempo (h) | $\alpha$ |
| 12         | 30       | 12         | 36       | 12         | 34       | 12         | 36       |
| 60         | 40       | 60         | 46       | 60         | 34       | 60         | 40       |
| 84         | 32       | 84         | 36       | 84         | 34       | 84         | 34       |
| 156        | 26       | 156        | 32       | 156        | 16       | 156        | 36       |

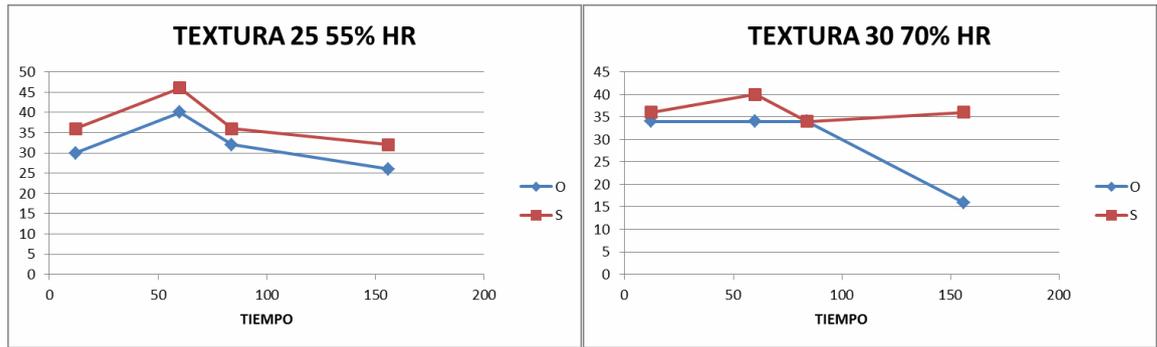


Figura 13: Comparación del desarrollo de la textura con relación al tiempo entre las muestras S y O para condiciones ambientales Costa y Sierra.

### 3.1.6 Sabor

El sabor es una de las características del producto que podrían desarrollarse positivamente con respecto al tiempo, sin embargo en las muestras se puede observar que tiene sus valores más altos en los primeros días, pero sin perderse considerablemente a lo largo del tiempo. En las condiciones sierra se observa que el sabor es igualmente apreciado de una muestra a otra, mas no así en las condiciones costa, donde el sabor se mantuvo sin variaciones muy grandes en las muestras (S), a diferencia de las muestras (O), donde el sabor al final del tiempo estimado tuvo una caída considerable.

Tabla 6: Tabla de calificación de desarrollo de sabor con relación al tiempo en catas de pan (S y O)

| 25° 55%HR  |          |            |          | 30° 70%HR  |          |            |          |
|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|
| O          |          | S          |          | O          |          | S          |          |
| SABOR      |          | SABOR      |          | SABOR      |          | SABOR      |          |
| Tiempo (h) | $\alpha$ |
| 12         | 36       | 12         | 46       | 12         | 38       | 12         | 46       |
| 60         | 42       | 60         | 46       | 60         | 40       | 60         | 44       |
| 84         | 34       | 84         | 34       | 84         | 40       | 84         | 36       |
| 156        | 34       | 156        | 36       | 156        | 24       | 156        | 34       |

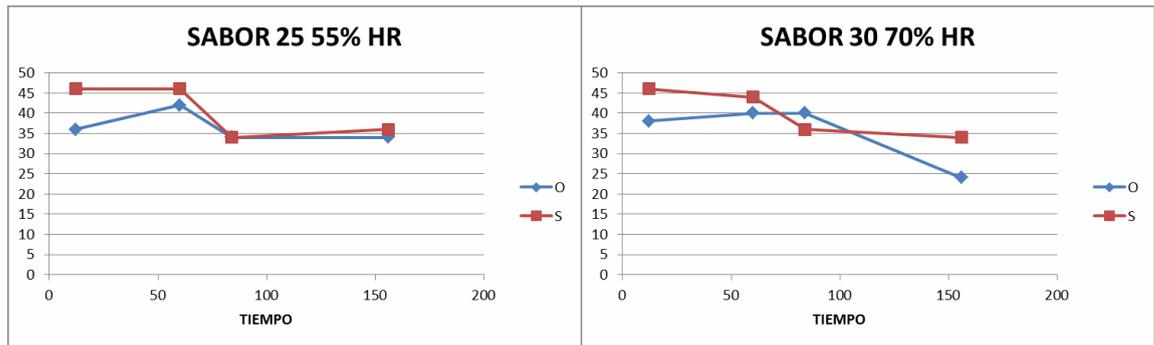


Figura 14: Comparación del sabor de aroma con relación al tiempo entre las muestras S y O para condiciones ambientales Costa y Sierra.

### 3.1.7 Miga

La textura de la miga, determinada por su dureza, maleabilidad y consistencia, determina junto con la textura en general del pan el nivel de retrogradación sufrido por el almidón durante el tiempo de almacenamiento, ya sea por pérdida o ganancia de humedad, o la acción de microorganismos que degradan las moléculas de almidón y proteína presentes en el producto.

En las muestras analizadas, los panelistas determinaron que los panes (S) tenían una mejor consistencia de la miga, con respecto a los panes (O), otorgándoles una calificación superior en los dos casos. Y al momento de finalización del tiempo de vida útil, la textura de los panes (S) aún eran apreciados como pan fresco, mientras que los panes (O) fueron catalogados como duros, o “pan guardado”.

Tabla 7: Tabla de calificación de desarrollo de la miga con relación al tiempo en catas de pan (S y O)

| 25° 55%HR  |          |            |          | 30° 70%HR  |          |            |          |
|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|
| O          |          | S          |          | O          |          | S          |          |
| MIGA       |          | MIGA       |          | MIGA       |          | MIGA       |          |
| Tiempo (h) | $\alpha$ |
| 12         | 40       | 12         | 50       | 12         | 38       | 12         | 50       |
| 60         | 28       | 60         | 40       | 60         | 38       | 60         | 30       |
| 84         | 30       | 84         | 30       | 84         | 30       | 84         | 32       |
| 156        | 22       | 156        | 30       | 156        | 20       | 156        | 28       |

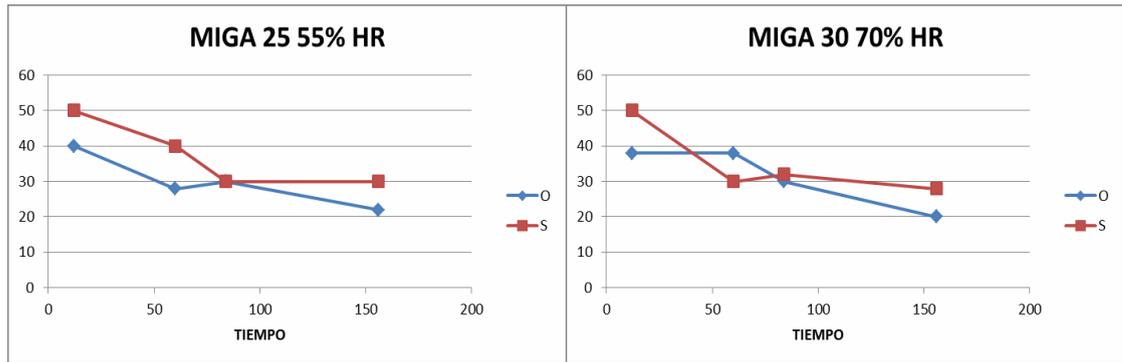


Figura 15: Comparación del desarrollo de la miga con relación al tiempo entre las muestras S y O para condiciones ambientales Costa y Sierra.

### 3.1.8 Color

En la catalogación de los panes por su color a lo largo del tiempo, prácticamente no existieron diferencias percibidas por los panelistas, de esta manera se determinó que los productos tanto (S) como (O), no podían ser distinguidos unos de otros, basándose en el color.

Tabla 8 Tablas de calificación de desarrollo de color con relación al tiempo en catas de pan (S y O):

| 25° 55%HR  |          |            |          | 30° 70%HR  |          |            |          |
|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|
| O          |          | S          |          | O          |          | S          |          |
| COLOR      |          | COLOR      |          | COLOR      |          | COLOR      |          |
| Tiempo (h) | $\alpha$ |
| 12         | 38       | 12         | 40       | 12         | 38       | 12         | 40       |
| 60         | 42       | 60         | 46       | 60         | 38       | 60         | 44       |
| 84         | 42       | 84         | 46       | 84         | 42       | 84         | 40       |
| 156        | 40       | 156        | 40       | 156        | 40       | 156        | 40       |

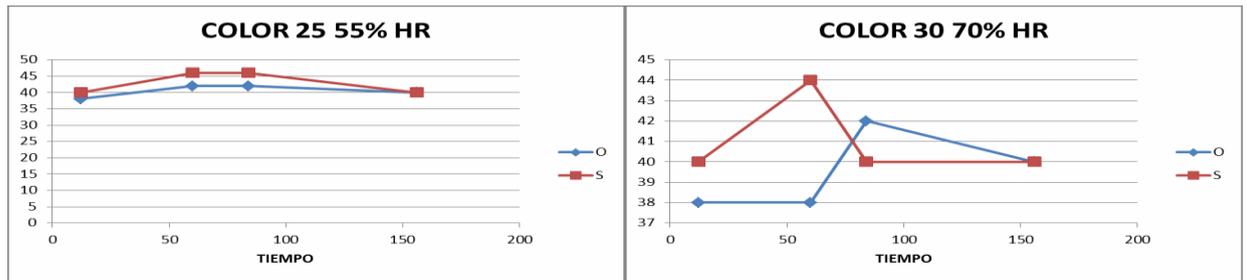


Figura 16: Comparación del desarrollo de color con relación al tiempo entre las muestras S y O para condiciones ambientales Costa y Sierra.

### 3.2 Análisis microbiológico.

Se efectuó análisis para evaluar la presencia de hongos y levaduras a lo largo del tiempo de vida útil del producto. Los hongos y levaduras determinan la calidad microbiológica de una muestra, ya que la Norma Técnica ecuatoriana para pan nos permite la presencia de hasta 5UFC por unidad de medida para estos microorganismos,

Los hongos y levaduras son principales causantes de la degradación y retrogradación de los almidones, proceso que causa el envejecimiento del pan. Además producen micotoxinas peligrosas para la salud del ser humano.

El análisis reveló la rapidez con la que los microorganismos analizados, en este caso hongos y levaduras, se desarrollaron en el producto a lo largo del tiempo. Las siguientes tablas expresan los conteos realizados a dos muestras diferentes, las cuales tuvieron la misma formulación, con diferente fecha de producción, los datos se los expreso de las muestras diluidas a  $10^{-1}$ . Las muestras fueron diluidas a:  $10^0$ ;  $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , pero no presentaron crecimiento microbiano luego de la dilución  $10^{-1}$ .

Tabla 9: Crecimiento microbiológico (hongos y levaduras) en las muestras S y O entre 2 y 9 días para condiciones sierra.

| <b>MUESTRA1</b>                                       | <b>TEMP25°C</b> | <b>HUMEDAD</b> |
|-------------------------------------------------------|-----------------|----------------|
| <b>75%<br/>HONGOS Y LEVADURAS UPC 10<sup>-1</sup></b> |                 |                |
| Tiempo(horas)                                         | <b>O</b>        | <b>S</b>       |
| 48                                                    | 0               | 0              |
| 96                                                    | 0               | 0              |
| 144                                                   | 0               | 0              |
| 216                                                   | 4               | 7              |

Tabla 10: Crecimiento microbiológico (hongos y levaduras) en las muestras S y O entre 2 y 9 días para condiciones costa

| <b>MUESTRA1</b>                                       | <b>TEMP30°C</b> | <b>HUMEDAD</b> |
|-------------------------------------------------------|-----------------|----------------|
| <b>70%<br/>HONGOS Y LEVADURAS UPC 10<sup>-1</sup></b> |                 |                |
| Tiempo(horas)                                         | <b>O</b>        | <b>S</b>       |
| 48                                                    | 0               | 0              |
| 96                                                    | 0               | 0              |
| 144                                                   | 0               | 3              |
| 216                                                   | 480             | 52             |

### 3.3 Vida útil

El análisis de datos realizado en software STATGRAPHICS Centurión otorgo los siguientes resultados para cada muestra de pan según sus condiciones de temperatura, humedad y presencia de bacterias lácticas en su formulación.

#### 3.3.1 Temperatura Sierra “O”

Tamaño de muestra = 15 Número de fallas =2

Forma estimada = 18,1725 Escala estimada = 214,675

Umbral especificado = 0,0

Esta tabla muestra los resultados de ajustar una distribución de Weibull a los valores de los datos. Los parámetros de forma y de escala fueron estimados usando el método de regresión ordinal, que corresponde a ajustar una línea recta a la gráfica de Weibull. Se asumió que el valor máximo de la distribución estaba localizado en 0,0. De los 15 datos, 13 fueron tratados como censurados por derecha, lo que significa que los valores reales pueden ser mayores que los indicados.

El parámetro de la forma, que es igual a 18,1725, indica que la tasa de fallos se incrementa con el tiempo. El parámetro de la escala, que es igual a 214,675, se relaciona directamente con el tiempo medio de falla, que es igual a 208,469.

Para pan sin inocular en condiciones de temperatura de 25°C con 55% de humedad ambiental el análisis reveló que el tiempo de vida útil es de 167 horas o su equivalente de 6.9 días.

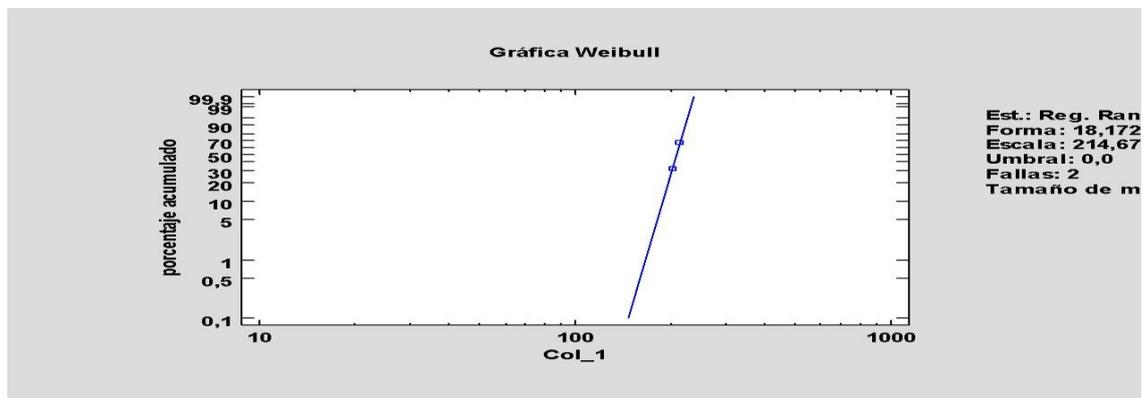


Figura 17: Weibull Porcentaje acumulado

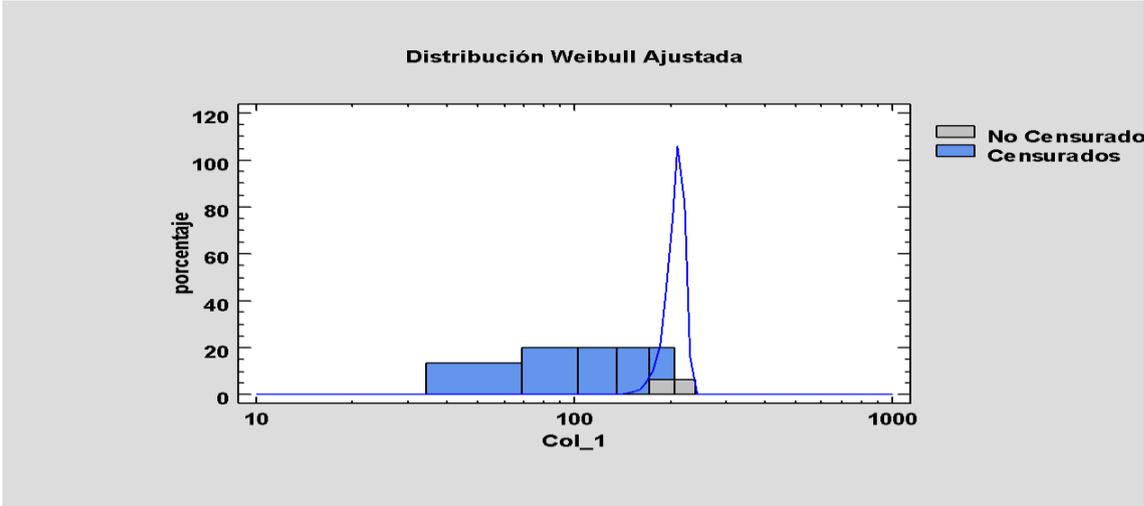


Figura 18: Histograma de Distribución Wellbull Ajustada

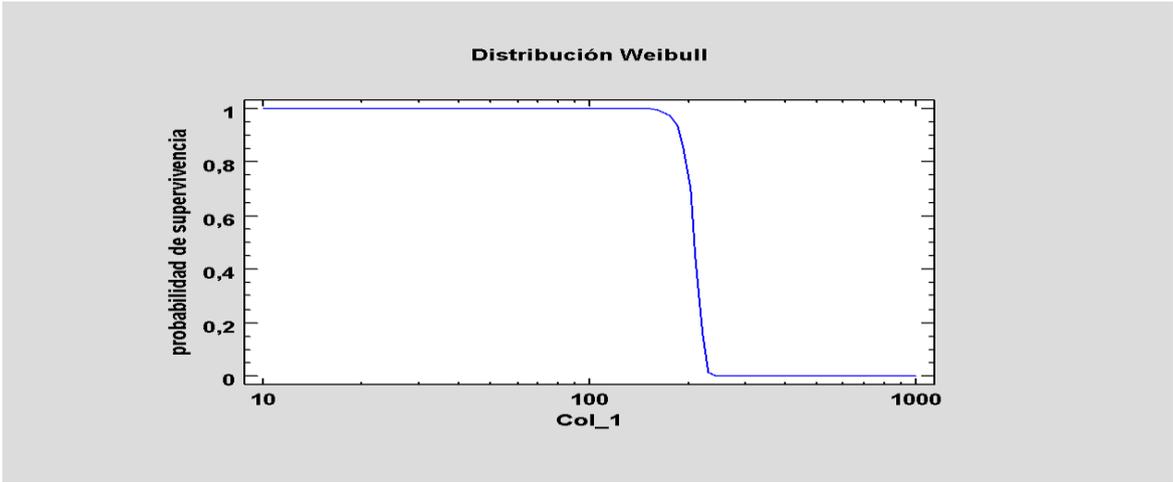


Figura 19: Probabilidad de supervivencia

Tabla 11 Valores críticos O sierra

| $X$            | Área Cola Inferior ( $<$ ) | Área Cola Superior ( $>$ ) |
|----------------|----------------------------|----------------------------|
| 166,666        | 0,01                       | 0,99                       |
| <b>189,671</b> | <b>0,1</b>                 | <b>0,9</b>                 |
| 210,389        | 0,5                        | 0,5                        |
| 224,757        | 0,9                        | 0,1                        |
| 233,496        | 0,99                       | 0,01                       |

### 3.3.2 Temperatura Sierra S

Tamaño de muestra = 17 Número de fallas = 2  
 Forma estimada = 20,1561 Escala estimada = 238,697  
 Umbral especificado = 0,0

Esta tabla muestra los resultados de ajustar una distribución de Weibull a los valores de los datos. Los parámetros de forma y de escala fueron estimados usando el método de regresión ordinal, que corresponde a ajustar una línea recta a la gráfica de Weibull. Se asumió que el valor máximo de la distribución estaba localizado en 0,0. De los 17 datos, 15 fueron tratados como censurados por derecha, lo que significa que los valores reales pueden ser mayores que los indicados. El parámetro de la forma, que es igual a 20,1561, indica que la tasa de fallos se incrementa con el tiempo.

Para pan inoculado en condiciones de temperatura de 25°C con 55% de humedad ambiental el análisis reveló que el tiempo de vida útil es de 190 horas o su equivalente de 7.9 días.

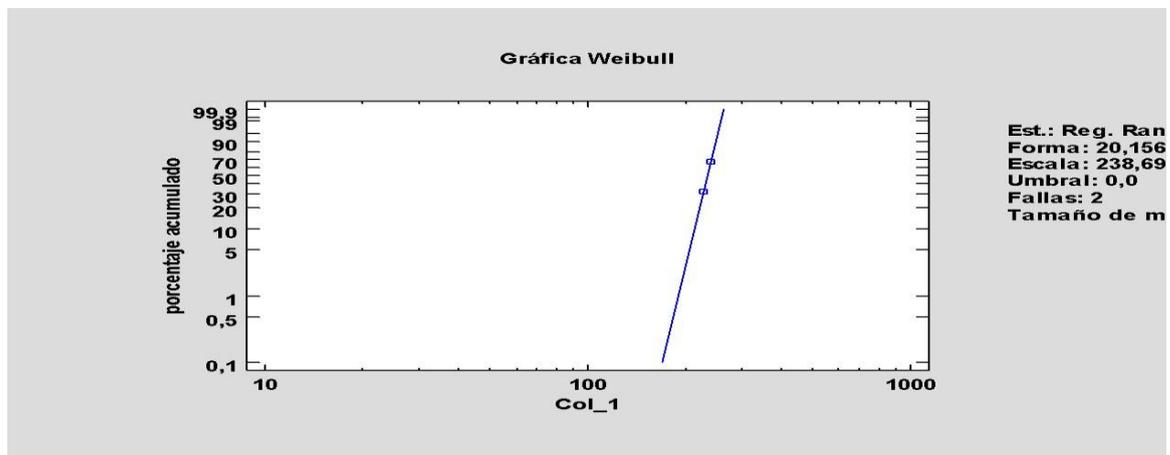


Figura 20: Wellbull porcentaje acumulado S sierra

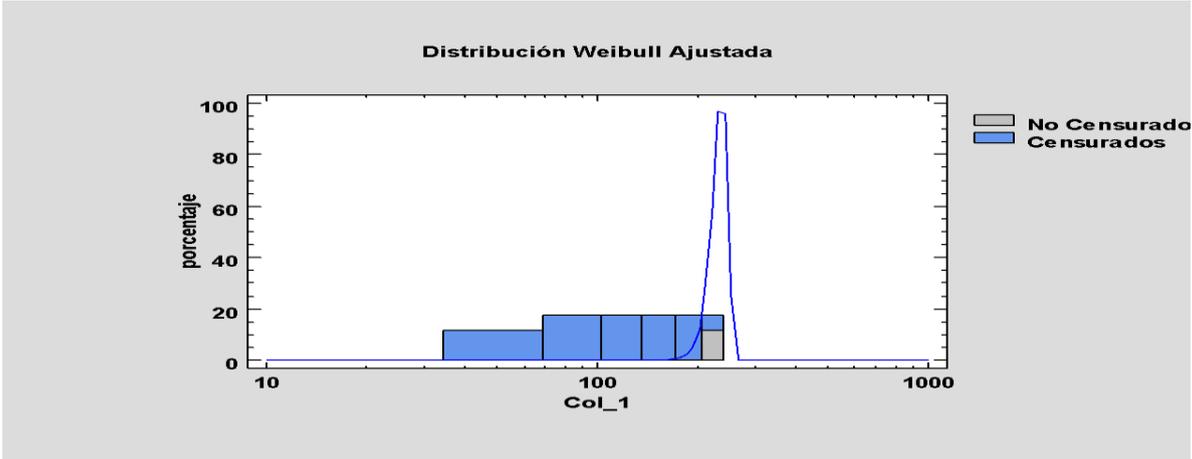


Figura 21: Histograma de Distribución Wellbull ajustada S sierra

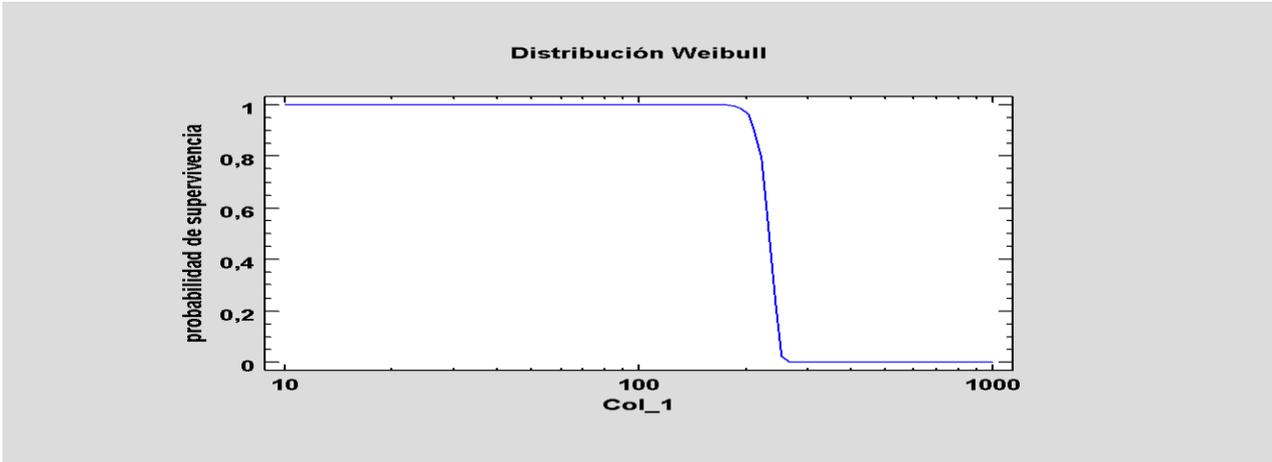


Figura 22: Probabilidad de supervivencia S sierra

Tabla 12 Valores críticos Sierra S

| <i>X</i> | <i>Área Cola Inferior (&lt;)</i> | <i>Área Cola Superior (&gt;)</i> |
|----------|----------------------------------|----------------------------------|
| 189,989  | 0,01                             | 0,99                             |
| 213,481  | 0,1                              | 0,9                              |
| 234,396  | 0,5                              | 0,5                              |
| 248,781  | 0,9                              | 0,1                              |
| 257,485  | 0,99                             | 0,01                             |

### 3.3.3 Temperatura Costa O

Tamaño de muestra = 15 Número de fallas = 3 Forma estimada = 14,035  
 Escala estimada = 210,171  
 Umbral especificado = 0,0

Esta tabla muestra los resultados de ajustar una distribución de Weibull a los valores de los datos. Los parámetros de forma y de escala fueron estimados usando el método de regresión ordinal, que corresponde a ajustar una línea recta a la gráfica de Weibull. Se asumió que el valor máximo de la distribución estaba localizado en 0,0. De los 15 datos, 12 fueron tratados como censurados por derecha, lo que significa que los valores reales pueden ser mayores que los indicados. Nota: Puede establecerse el origen de la distribución de Weibull a cualquier número menor que el valor mínimo en el conjunto de datos utilizando las Opciones de Análisis. El parámetro de la forma, que es igual a 14,0351, indica que la tasa de fallos se incrementa con el tiempo. El parámetro de la escala, que es igual a 210,171, se relaciona directamente con el tiempo medio de falla, que es igual a 202, 518.

Para pan inoculado en condiciones de temperatura de 30°C con 70% de humedad ambiental el análisis reveló que el tiempo de vida útil es de 151 horas o su equivalente de 6.2 días.

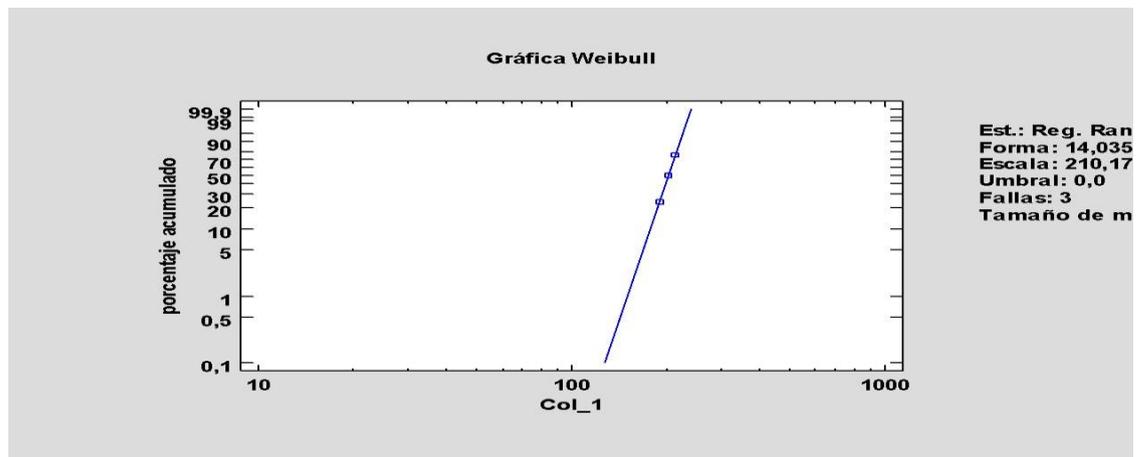


Figura 23: Weibull Costa O

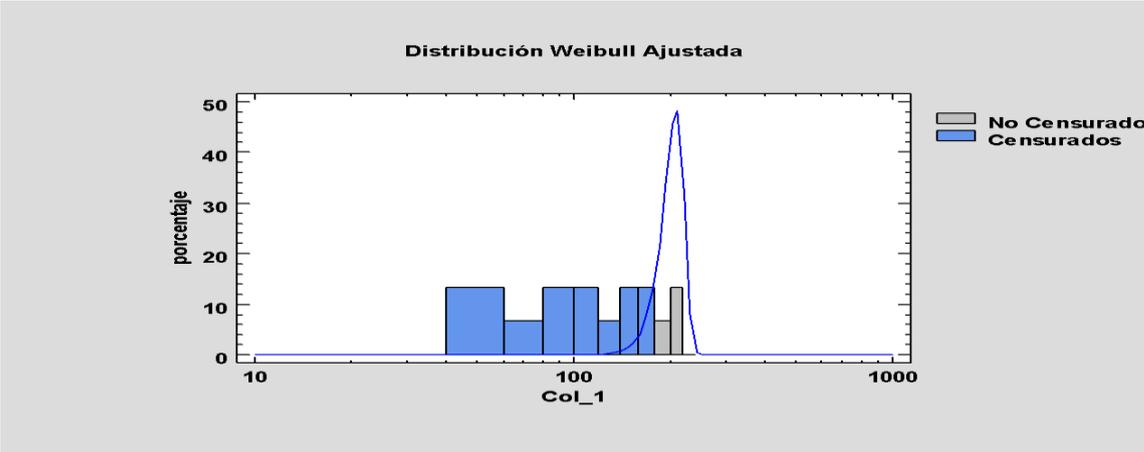


Figura 24: Histograma de Distribución Weibull ajustada Costa O

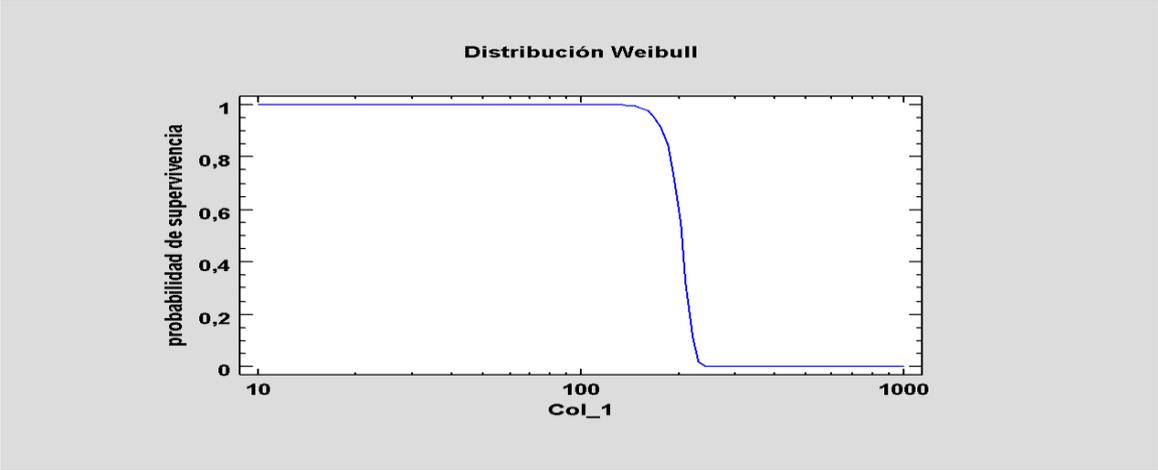


Figura 25: Probabilidad de supervivencia Costa O

Tabla 13 Valores críticos Costa O

| $X$     | Área Cola Inferior ( $<$ ) | Área Cola Superior ( $>$ ) |
|---------|----------------------------|----------------------------|
| 151,435 | 0,01                       | 0,99                       |
| 179,035 | 0,1                        | 0,9                        |
| 204,753 | 0,5                        | 0,5                        |
| 223,039 | 0,9                        | 0,1                        |
| 234,33  | 0,99                       | 0,01                       |

### 3.3.4 Temperatura costa S

Tamaño de muestra = 16 Número de fallas = 2  
 Forma estimada = 19,164 Escala estimada = 226,687  
 Umbral especificado = 0,0

Esta tabla muestra los resultados de ajustar una distribución de Weibull a los valores de los datos en Col\_1. Los parámetros de forma y de escala fueron estimados usando el método de regresión ordinal, que corresponde a ajustar una línea recta a la gráfica de Weibull. Se asumió que el valor máximo de la distribución estaba localizado en 0,0. De los 16 datos, 14 fueron tratados como censurados por derecha, lo que significa que los valores reales pueden ser mayores que los indicados. El parámetro de la forma, que es igual a 19,164, indica que la tasa de fallos se incrementa con el tiempo. El parámetro de la escala, que es igual a 226,687, se relaciona directamente con el tiempo medio de falla, que es igual a 220,442.

Para pan inoculado en condiciones de temperatura de 30°C con 70% de humedad ambiental el análisis reveló que el tiempo de vida útil es de 178 horas o su equivalente de 7.4 días.

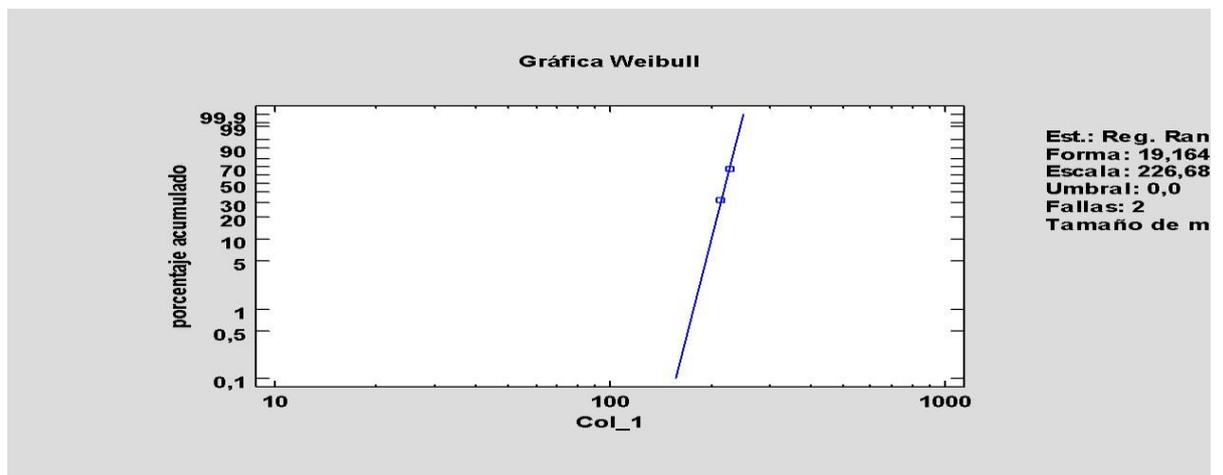


Figura 26: Weibull Costa S

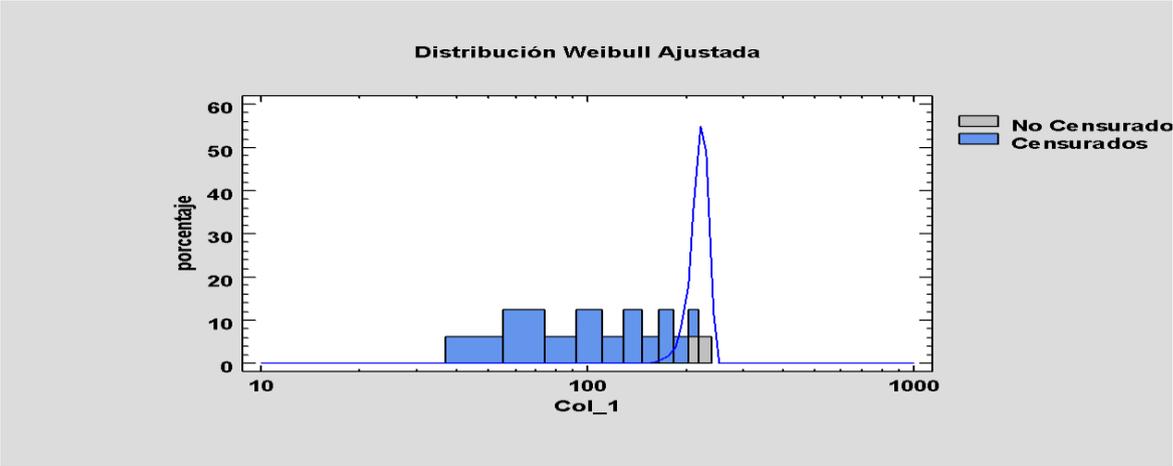


Figura 27: Histograma de distribución Weibull Ajustada Costa S

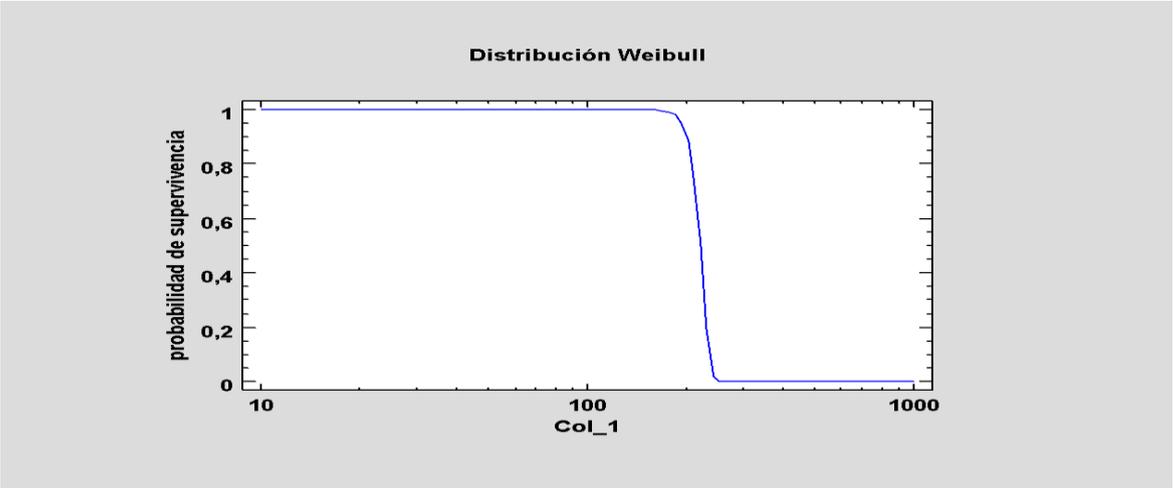


Figura 28: Probabilidad de supervivencia Costa

Tabla 15 Valores críticos Costa S

| $X$     | Área Cola Inferior ( $<$ ) | Área Cola Superior ( $>$ ) |
|---------|----------------------------|----------------------------|
| 178,311 | 0,01                       | 0,99                       |
| 201,571 | 0,1                        | 0,9                        |
| 222,392 | 0,5                        | 0,5                        |
| 236,77  | 0,9                        | 0,1                        |
| 245,491 | 0,99                       | 0,01                       |

### 3.4 Hidrólisis de proteínas

El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) aplicado a las muestras de masas inoculadas y sin inocular, determinó la cantidad de gliadina que se redujo por el metabolismo de los microorganismos presentes. En cada una, el análisis se realizó por cuadruplicado, y tomando como referencia una masa con la misma formulación, pero con ausencia de microorganismos, y sin tiempo de fermentación. A cada masa las denominamos como:

Masa Madre sin fermentar; en relación a la masa inicial sin fermentación ni inoculación microbiana.

Masa Madre LPRA; en relación a la masa inoculada con *L. plantarum* y *L. rhamnosus*.

Masa madre *L. plantarum*; en relación a la masa inoculada solamente con *L. plantarum*.

Los resultados arrojados por el análisis determino que las masas redujeron su cantidad de gliadina expresada en ppm en las siguientes proporciones.

Tabla 16: Valores de disminución de gliadina en masa inoculada con *L. Plantarum*; y con mezcla de sepas, comparadas con una masa sin fermentar.

| <b>Disminución de gliadina</b>           |            |            |                              |                                                                        |      |
|------------------------------------------|------------|------------|------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Muestra</b>                           | <b>abs</b> | <b>ppm</b> | <b>ppm por porcion (70g)</b> | <b>Porcentaje presente de gliadina con relación a MM sin fermentar</b> |      |
| Masa Madre sin fermentar                 | 0,488      | 14         | 980                          | 100%                                                                   | -    |
| Masa Madre LPRA                          | 0,457      | 11         | 770                          | 78%                                                                    | ↓22% |
| Masa Madre <i>L. plantarum</i>           | 0,452      | 10,5       | 735                          | 75%                                                                    | ↓25% |
| <b>Relación con pan comercial.</b>       |            |            |                              |                                                                        |      |
| <b>Muestra</b>                           | <b>abs</b> | <b>ppm</b> | <b>ppm por porcion (70g)</b> | <b>porcentaje de gliadina con relacion a pan comercial.</b>            |      |
| Pan Comercial (La moderna)               | 0,736      | 43,6       | 3052                         | 100%                                                                   | -    |
| Masa Madre sin batir <i>L. plantarum</i> | 0,606      | 26,4       | 1848                         | 60%                                                                    | ↓40% |
| Masa Madre sin batir LPRA                | 0,636      | 30         | 2100                         | 68%                                                                    | ↓32% |
| Pan Inoculado (S) MM batida              | 0,626      | 28,9       | 2023                         | 66%                                                                    | ↓34% |

Tabla 17: Diferencia entre las cantidades de gliadina de las muestras preparadas, comparadas con un pan comercial de expendio en la ciudad.

| Disminución de gliadina  |       |      |                       |                                                                 |       |
|--------------------------|-------|------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------|-------|
| Muestra                  | abs   | ppm  | ppm por porcion (70g) | Porcentaje presente de gliadina con relación a MM sin fermentar |       |
| Masa Madre sin fermentar | 0,488 | 14   | 980                   | 100%                                                            | -     |
| Masa Madre LPRA          | 0,457 | 11   | 770                   | 78%                                                             | ↓ 22% |
| Masa Madre l. plantarum  | 0,452 | 10,5 | 735                   | 75%                                                             | ↓ 25% |

### 3.5 Diferencia entre las cantidades de gliadina de las muestras preparadas, comparadas con un pan comercial de expendio en la ciudad.

En el estudio se analizaron muestras provenientes de la hidratación e inoculación de harina de trigo para panadería, donde no se aplicó un amasado o mezclado intenso a la harina, con lo cual limitamos el desarrollo de gluten en la masa madre

Con el análisis de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) pudimos ver el comportamiento de las masas formuladas y verificar la diferencia con relación a un pan comercial de expendio en un supermercado de la ciudad, donde se compara la carga de gliadina entre el pan formulado con masa madre inoculada, las masas sin desarrollo de gluten y un pan comercial, tomando a este último como referencia para determinar la diferencia en la cantidad de gliadina final en cada producto.

Tabla 18 Valores de comparación entre masas inoculadas, pan elaborado base de masa fermentada y un pan comercial de expendio en la ciudad.

| Relación con pan comercial.       |       |      |                       |                                       |       |
|-----------------------------------|-------|------|-----------------------|---------------------------------------|-------|
| Muestra                           | abs   | ppm  | Ppm por porción (70g) | Porcentaje de gliadina con relación a |       |
| Pan Comercial (La moderna)        | 0,736 | 43,6 | 3052                  | 100%                                  | -     |
| Masa Madre sin batir l. plantarum | 0,606 | 26,4 | 1848                  | 60%                                   | ↓ 40% |
| Masa Madre sin batir LPRA         | 0,636 | 30   | 2100                  | 68%                                   | ↓ 32% |
| Pan Inoculado (S)                 | 0,626 | 28,9 | 2023                  | 66%                                   | ↓ 34% |

### 3.6 DISCUSIÓN

La evolución de las masas en el tiempo de fermentación es compleja debido a las actividades proteolíticas de las BAL. La producción de peptidasas durante la fermentación contribuye a la proteólisis degradando cadenas pépticas a aminoácidos, los cuales influyen en la percepción organoléptica, tanto de aroma, sabor y textura en la producción de pan. La proteólisis de las proteínas presentes en la masa durante una fermentación guiada por levaduras no llega a degradar en cantidades considerables del gluten, ni ayuda a disminuir el índice tóxico de los fragmentos de  $\alpha$ -gliadina, responsables de la reacción celíaca en el intestino humano.

Sin embargo, las bacterias lácticas han demostrado ser efectivas en metabolizar las proteínas del gluten, reduciéndolas a cadenas más pequeñas que no afectan la mucosa intestinal. De esta manera la acidificación de masas de harina de trigo, guiadas por *Lactobacillus plantarum*, confirmaron que son viables para una reducción efectiva y considerable de los fragmentos tóxicos de  $\alpha$ -gliadina hasta en un 25%. Rollán et al, realizaron trabajos similares en el 2005, donde mediante cromatogramas líquidos encontraron que cepas específicas de *Lactobacillus plantarum* como la CRL 778 ó la CRL 759 fueron capaces de hidrolizar fracciones de gliadina pura sintetizada químicamente hasta en un 54% de la fracción total. Además determinaron que son la cepa más eficiente en cuanto a hidrólisis de la gliadina, comparando con cepas como *Lactobacillus sanfrancisco* o *Lactobacillus higaridii*, las cuales no lograron hidrolizar más de un 40%.

Si bien se logró confirmar que el *Lactobacillus plantarum* redujo la gliadina en las masas fermentadas, se corroboró que su combinación con otras cepas como *Lactobacillus rhamnosus*, no influyo significativamente en la degradación final de la gliadina, lo cual ratifico que diversas cepas de *Lactobacillus* pueden actuar simbióticamente, aunque no causen un efecto aumentado en la degradación proteica.

En el 2011, Gerez et, al descubrieron que *Lactobacillus plantarum* trabajando en conjunto con *Pediococcus pentosaceus* produjeron una concentración de aminoácidos provenientes de la degradación de la gliadina en masas de un 121% más, comparado a la cantidad determinada en masa fermentada únicamente por

*Lactobacillus plantarum*. Este hallazgo demuestra que existen vías de aplicación más óptimas que pueden ser utilizadas en el desarrollo de masas hidrolizadas.

En adición a la comprobación de la reducción de la gliadina en las masas, se evaluó la diferencia entre la degradación de una masa muy trabajada y con su gluten desarrollado al máximo, y una masa apenas hidratada. Se inoculó el sustrato con bacterias en harina de trigo para panificación en una proporción de 1:1, donde una muestra fue sometida a un proceso de amasado intenso, mientras que la segunda se limitó a hidratar la harina con la leche inoculada con la cepa.

Al final del tiempo de fermentación de 5 días, las dos masas sufrieron un proceso de licuefacción, donde la autólisis del sustrato fue evidente, a simple vista se pudo notar la diferencia de las muestras en el tiempo de fermentación, donde al inicio del tiempo se catalogaban como una masa común, elástica y en forma esférica. Al final del tiempo de fermentación la diferencia era evidente, donde ambas masas se habían convertido en un líquido viscoso de un color pardo y habían perdido su capacidad elástica. En este punto no se podían diferenciar visualmente entre la masa hidratada, y la masa que sufrió el amasado intenso

Se analizó los niveles de gliadina presentes en cada muestra, donde se comprobó que la presencia de la cepa *Lactobacillus plantarum* redujo la cantidad cuantificable de la proteína en la masa hasta un 25%. Además se determinó que la presencia de *Lactobacillus rhamnosus* no influye considerablemente en la reducción de gliadina, ya que las masas evaluadas que contenían la mezcla *L.rhamnosus* + *L. plantarum* redujeron la cantidad de gliadina en un 22%. Estos valores fueron determinados en comparación con una masa sin inoculación ni fermentación de ningún tipo, pero con la misma relación de compuestos iniciales.

El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas determinó que existe una ligera diferencia entre la acción de las bacterias en las masa según el proceso aplicado a la masa, siendo más efectivas en las masas sin batir, donde la gliadina se redujo hasta un 6% más que en las masas con alto desarrollo de gluten, esto pudiendo interpretarse como que la formación de la red proteica brinda cierta protección a las moléculas de gliadina, al limitar la disponibilidad de las mismas para metabolización de las bacterias lácticas.

Los datos obtenidos revelan que la degradación de la gliadina no es suficiente para catalogar el producto como “libre de gluten” ya que para que un producto sea calificado como tal debe tener un contenido no mayor a 20 ppm (PARADA, 2010). Pero se lo puede catalogar como un producto reducido en gluten, al tener un 34% menos de gliadina que un pan convencional al reducir de 3052ppm/porción, a 2023ppm/porción. Por otro lado las masas fermentadas pueden ser base para la elaboración de galletas saladas tipo cracker, las cuales no requieren de adición extra de harina de trigo, permitiéndonos tener hasta un 60% de reducción de gliadina con relación a un pan comercial, que de igual manera no se lo considera como libre de gluten, pero puede satisfacer a mercados donde personas no celiacas optan por una dieta reducida en gluten.

Al analizar la vida útil del producto, los panes elaborados con lacto fermento ofrecieron un mejor estancamiento de sus características a lo largo del tiempo, con lo cual podemos implicar que las bacterias lácticas presentes produjeron una variedad de compuestos bactericidas, que limitaron el crecimiento de microorganismos perjudiciales para las características organolépticas como reológicas del producto final, y se comprobó que tanto hongos como levaduras reducen su crecimiento en los productos fermentados con bacterias lácticas. Si bien los productos que sufrieron la fermentación láctica dieron un día más de vida útil, los análisis microbiológicos revelaron que el crecimiento microbiano fue considerablemente menor en estos. Aunque el nivel de UFC presentes supero la presencia que se puede considerar apta para el consumo humano, el número de UFC contadas en placa para el pan O en condiciones costa fue de 480UFC/g de producto, mientras en el pan S en las mismas condiciones ambientales, el número de colonias llego apenas a 52 UFC/g. Las BAL pueden ser usadas como cepas iniciadoras de la fermentación en la producción de pan para aumentar las características reológicas y extender su vida de anaquel. Además el valor nutricional del pan se ve incrementado, al portar aminoácidos libres, ácidos orgánicos y vitaminas del grupo B. los compuestos anti fúngicos producidos por las BAL tienen un gran potencial dentro de la industria alimentaria al remplazar conservantes químicos. Sin embargo aún queda por encontrar cepas que no afecten al crecimiento de levaduras durante la fermentación (Belal J. Muhialdin, 2013).

## CONCLUSIONES

- Los hallazgos encontrados evidencian que las bacterias *Lactobacillus plantarum* degradan las proteínas del gluten reduciendo las cadenas de  $\alpha$ -gliadina en la composición final de las masas.
- Sin embargo, el hecho de haber reducido la carga de las cadenas proteicas causantes de la reacción celiaca, no garantizo la eliminación total de la gliadina en el producto, por lo tanto no se lo puede denominar como un producto libre de gluten.
- La fermentación láctica brindó a los panes elaborados un tiempo de vida útil superior a los que carecieron de ella, demostrando que los metabolitos provenientes de las BAL actúan como fungicidas que podrían suplantar la adición de conservantes químicos.

## BIBLIOGRAFIA

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. (Agosto de 2011). Recuperado el 19 de Enero de 2016, <http://aem.asm.org/content/77/15/5247/F4.expansion.html>

Camacho A, M. A. (2009). Obtenido de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-mohos-levaduras\\_6530.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-mohos-levaduras_6530.pdf)

CLAUDIA THIELE, S. G. (2004). Gluten Hydrolysis and Depolymerization during Sourdough fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1307- 1314.

D. Belitz, R. K. (1986). *Structure and function of gluten proteins*. Munich: UNIVERSITY OF MUNICH.

David S Reid, T. S. (2010). *Water properties in food, health, pharmaceutical and biological systems*. Arnes: Wiley Blackwell.

Eljas, Y. (18 de Noviembre de 2012). *Medical News Digest*. Recuperado el 19 de Enero de 2016,

Belal J. Muhialdin, Z. H. (2013). *Lactic Acid Bacteria in Biopreservation and the Enhancement of the Functional Quality of Bread* . INTECH .

Carla Luciana Gereza, A. D. (2011). A combination of two lactic acid bacteria improves the hydrolysis of gliadin during wheat dough fermentation. *Food Microbiology* .

G. Rollán, M. d. (2005). Proteolytic activity and reduction of gliadin-like fractions by sourdough lactobacilli. *Journal of applied microbiology* , 1495-1502.

Erich Lück, M. J. (2000). *Conservación química de los alimentos*. Acribia.

F.C Ibáñez, Y. (2001). *Análisis sensorial de alimentos*. Barcelona: Springer-Verlag.

Fernanda Delgado González, A. C.-L. (2012). *Elaboración de productos de panadería*. INAF0108. IC.

G. Zehentbauer, W. G. (1998). *Crust Aroma of Baguettes I. Key Odorants of Baguettes Prepared in Two Different Ways*. ELSEVIER.

Gokcen Komen, A. H. (2009). Structural changes of gliadins during sourdough fermentation. *Izmir*.

Huertas, R. A. (2010). *Bacterias Acido Lácticas: Papel funcional en los alimentos*. 93-105.

Jager, E. L. (1995). *Conservación Química de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia.

- Lewis, C. (2015). ENTEROINMUNOLOGY: A guide to the prevention and treatment of chronic inflammatory disease. Carrbelle: PSY PRESS.
- Lezcano, I. A. (2010). Productos panificados. Alimentos argentinos, 26-38.
- Luis Rodrigo Peña, A. P. (2013). Enfermedad celiaca y sensibilidad al gluten no celiaca. Barcelona: OmniaScience.
- M. M. Moore, F. D. (2008). Sourdough fermented by *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 improves the quality and shelf life of gluten-free bread. Springer-Verlag.
- Magnusson, J. (2003). Antifungal activity of lactic acid bacteria. Doctor' dissertation.
- Manuel Gómez Pallarés, A. E. (2006). EL TRIGO. DE TALES HARINAS, TALES PANES: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica, 17- 73.
- María Cristina Lurá, A. M. (1997). Introducción al estudio de la Micología. Santa Fe: UNL.
- Miranda Castro L., E. V. (2012). DETERMINACIÓN DE LA VIDA DE ANAQUEL DE PAN ELABORADO ARTESANALMENTE SIN Y CON LA ADICIÓN DE PROPIONATO DE SODIO. RESPYN, 163-168.
- Nyuk Ling Chin, G. M. (2005). Dough aeration and rheology. II. Effects of flour type, mixing speed and total work input on aeration and rheology of bread dough. Manchester: Journal of the Science of Food and Agriculture.
- Olimpia Pepea, G. B. (2004). Technological and Molecular Diversity of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Naturally Fermented Sourdoughs. ELSEVIER, 443-453.
- PARADA, A. (2010). El gluten. Su historia y efectos en la enfermedad celiaca. Rev Med, 1319-1325.
- Phimolsiripol, Y. (2003). Shelf Life Determination of Frozen Bread Dough. Chiang Mai: Chiang Mai University.
- Quaglia, G. (1991). Ciencia y Tecnología de la Panificación. Zaragoza: Acribia.
- Rosario Pascual, V. C. (2000). Microbiología alimentaria metodología analítica para alimentos y bebidas. Madrid: Diaz de Santos.
- Rositsa Denkova, S. I. (2014). Examination of the technological properties of newly isolated strains of the genus *Lactobacillus* and possibilities for their application in the production of starters. Biotechnology & Biotechnological Equipment.
- Rositsa Denkova, S. I. (2014). Examination of the technological properties of newly isolated strains of the genus *Lactobacillus* and the possibilities for their application in

the composition of starters. Sofia: BAS.

Runge, M. Ø. (2009). Lactic acid bacteria from an industrial perspective. CHR HANSEN.

Salgado, A. (2012). Métodos de control de crecimiento microbiano en el pan. Puebla.

Totora, G. J. (2007). Introducción a la microbiología. Mexico: media panamericana.

VittorioCapozzi, P. M. (2012). Biotechnology and pasta-making: lactic acid bacteria as a new driver of innovation. Foggia.

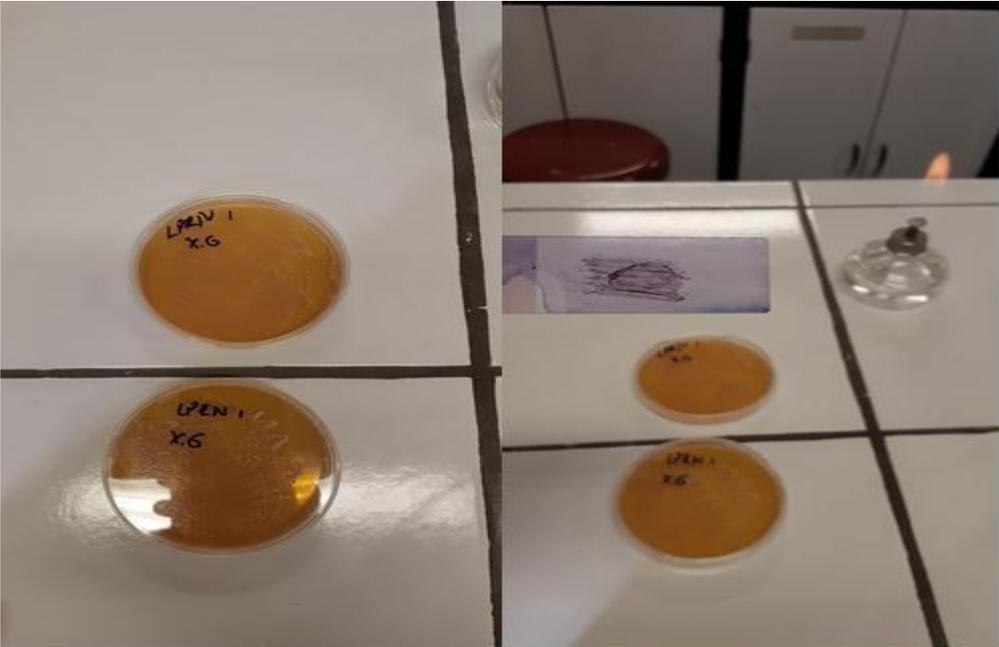
Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. ELSEVIER, 115-119.

Zaira T. MARIN A.1\*, M. C. (2009). EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE CRECIMIENTO DE LA CEPA NATIVA lactobacillus plantarum Y LA CEPA COMERCIAL lactobacillus casei EN PULPA DE UCHUVA Y SOLUCION ISOTONICA DE GLUCOSA. VITAE, 210-217.

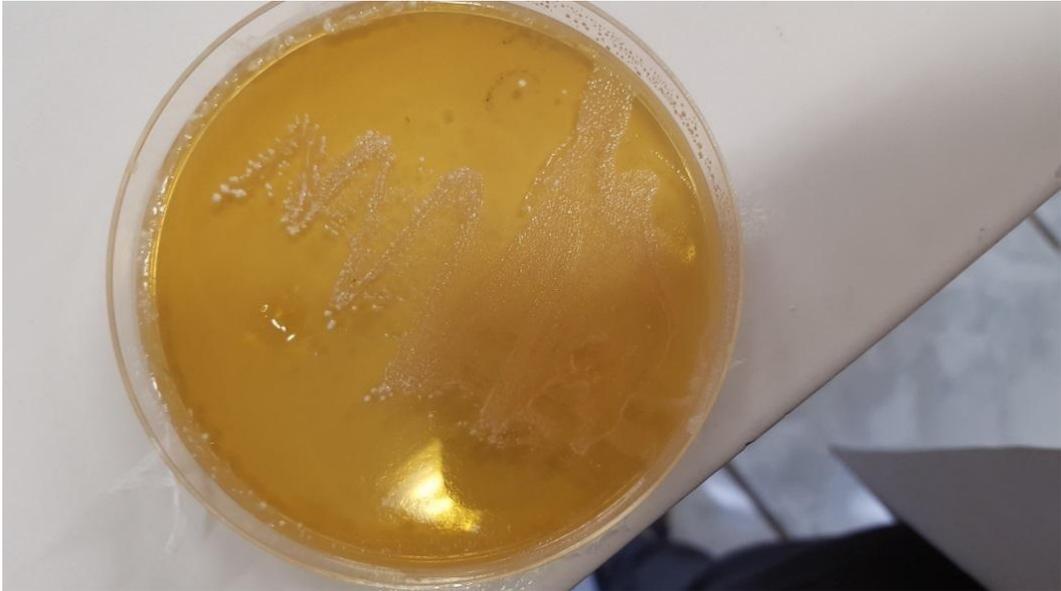
Zhangli Pan, G. G. (2011). Infrared heating for food and agricultural processing. Boca Ratón: CRC PRESS.

**ANEXOS.**

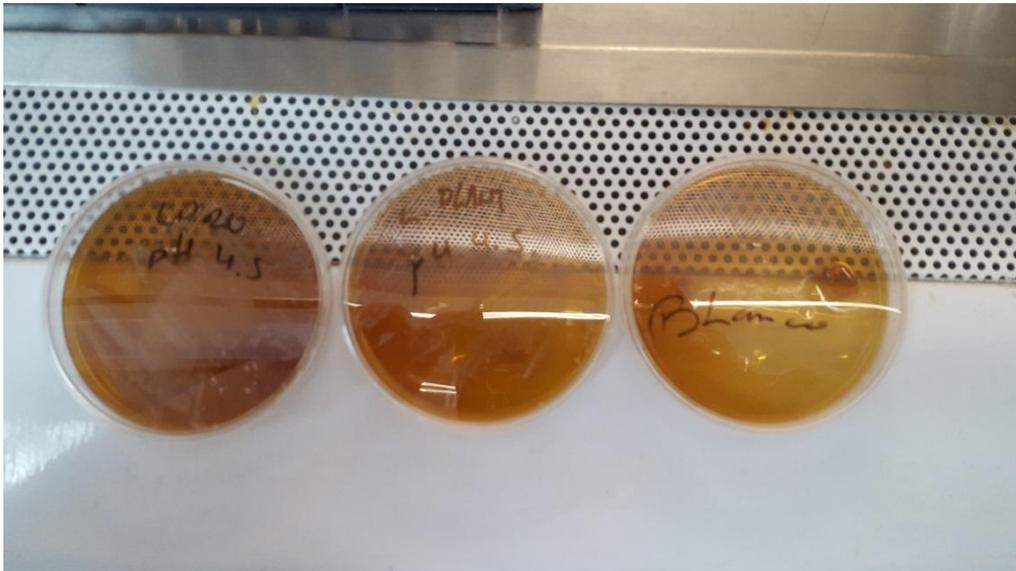
Anexo 1 Reproducción e identificación de bacterias lácticas



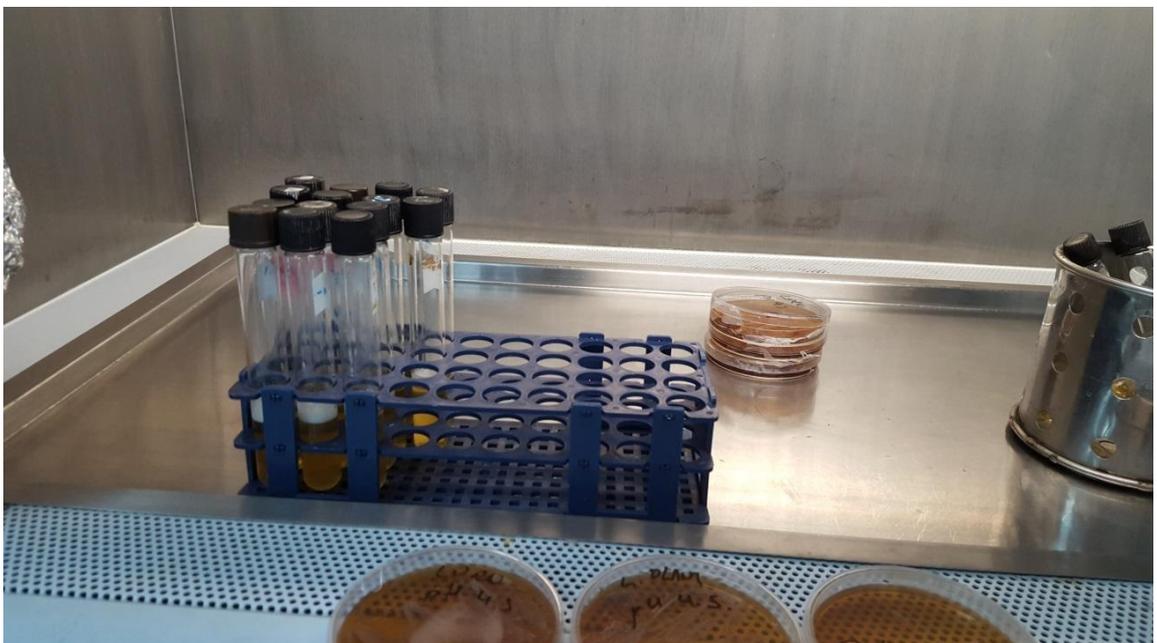
Anexo 2 Cepas lácticas provenientes de mezcla LPRV



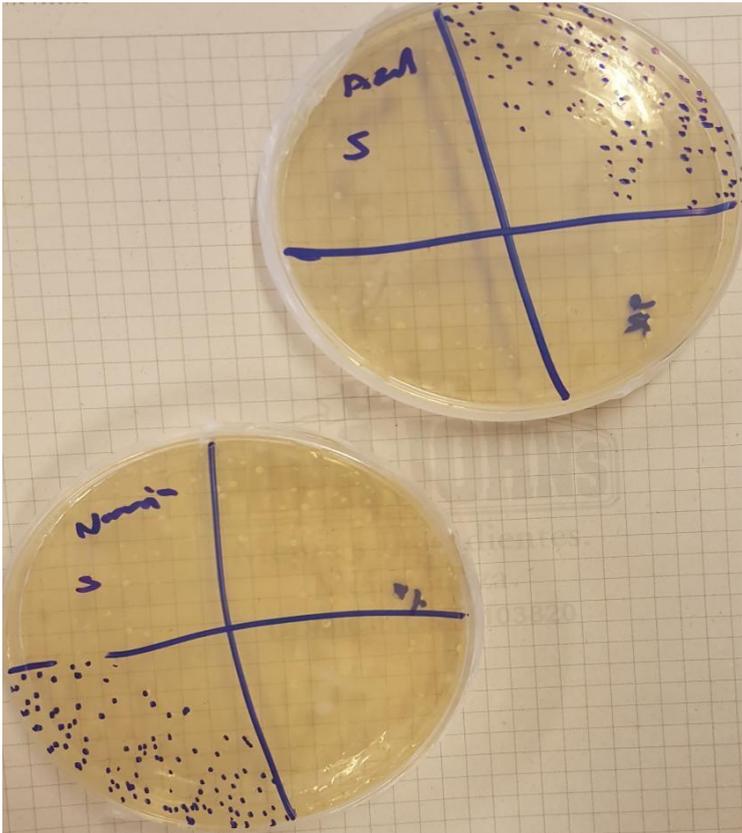
Anexo 3 Aislamiento de cepas por especificación de medio de crecimiento.



Anexo 4 Reproducción de cepas aisladas en caldo MRS con pH específico para crecimiento óptimo.



Anexo 5 Conteo microbiano en leche inoculada con bacterias aisladas.



Anexo 6 Leche inoculada con *L. plantarum* y LPR



Anexo 7 Masa madre a base de harina de trigo y leche inoculada con *Lactobacillus plantarum* relación 1:1.



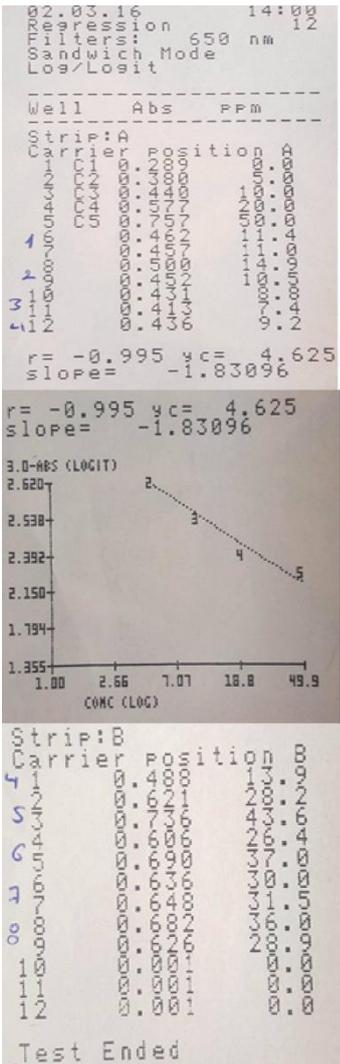
Anexo 8 Panes O y S al salir del horno.



Anexo 9 Panes O y S diferencia de la miga en un corte transversal.



Anexo 10 Valores de absorbancia y ppm obtenidos mediante método ELISA.



Anexo 11 Extracción de muestras de panes y masas.



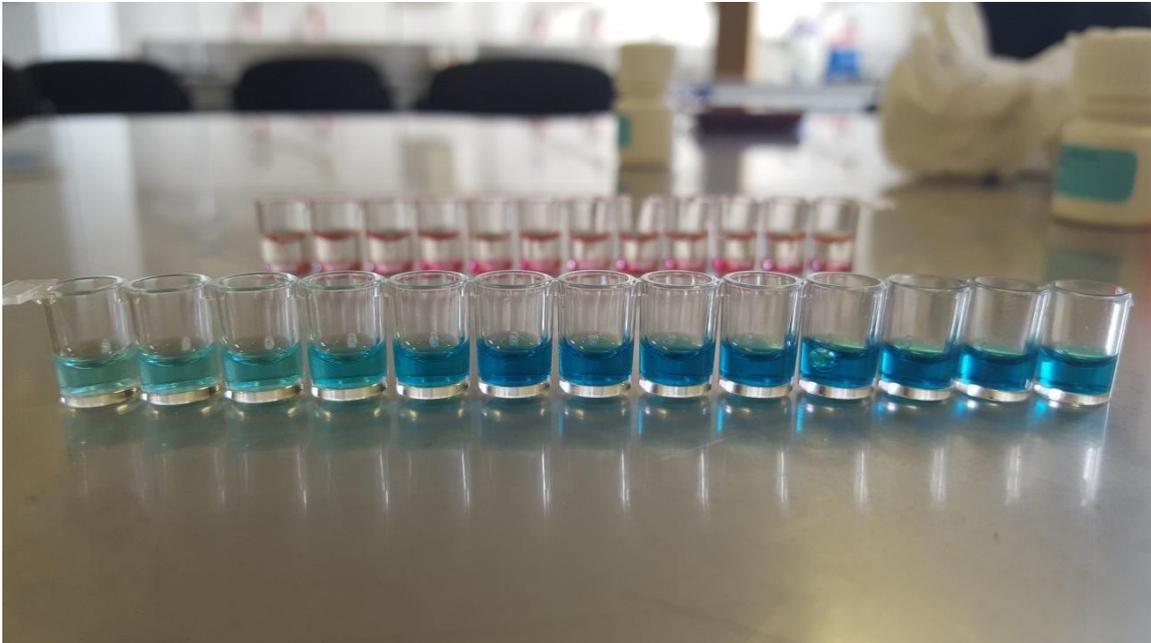
Anexo 12 Kit análisis ELISA



Anexo 13 Procedimiento para prueba de análisis ELISA.



Anexo 14 muestras listas para análisis de absorbancia.

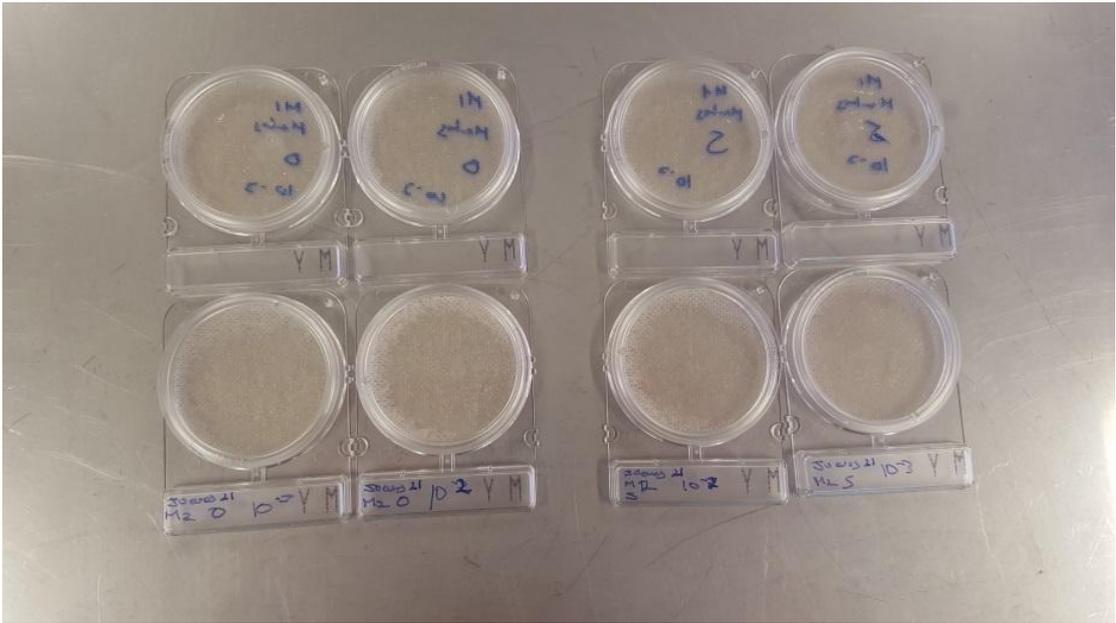




Anexo 17 Viscosidad de la masa a los 5 días de fermentación láctica.



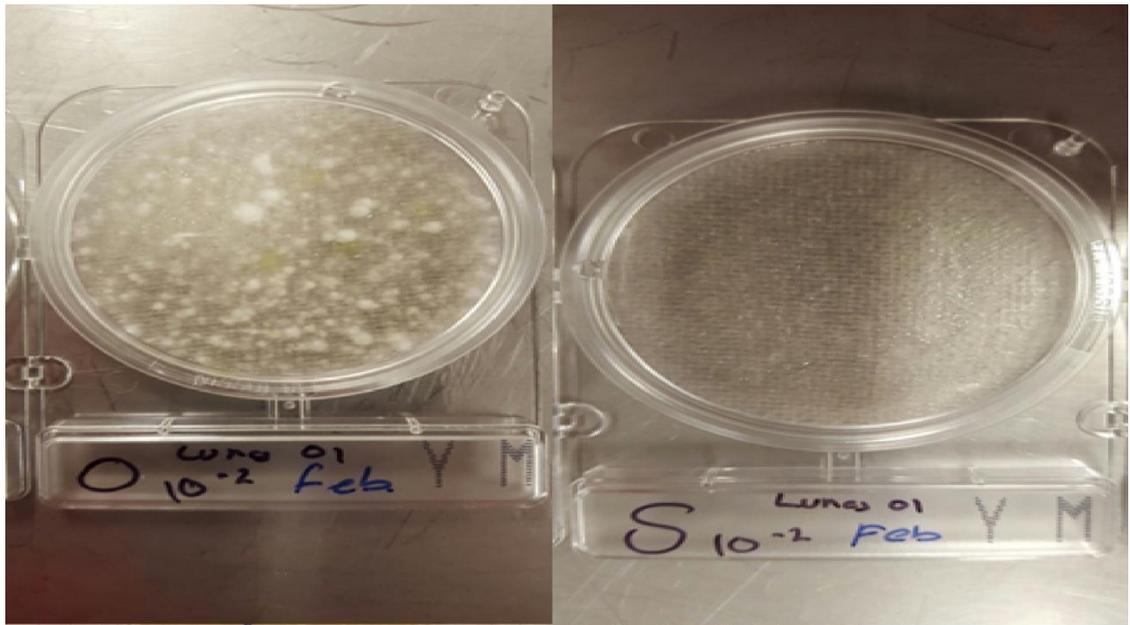
Anexo 18 Crecimiento microbiano ausente en los panes O y S en los días 2-6.



Anexo 19 Crecimiento de moho evidente en el pan O al día 12.



Anexo 20 Crecimiento microbiano en muestras O y S al día 12 de la prueba



Anexo 21 Instalación de panel de catación para la evaluación sensorial de las muestras.



Anexo 22: Tabla 19 Tabla de valores de aceptación o rechazo para análisis de vida útil

| MUESTRA1 TEMP25°C HUMEDAD 55% |   |   | MUESTRA1 TEMP25°C HUMEDAD 55% |   |   | MUESTRA1 TEMP30°C HUMEDAD 70% |     |   | MUESTRA1 TEMP30°C HUMEDAD 70% |    |   |
|-------------------------------|---|---|-------------------------------|---|---|-------------------------------|-----|---|-------------------------------|----|---|
| tiempo(horas)                 | O | S | tiempo(horas)                 | O | S | tiempo(horas)                 | O   | S | tiempo(horas)                 | O  | S |
| 48                            | 0 | 1 | 48                            | 0 | 1 | 48                            | 0   | 1 | 48                            | 0  | 1 |
| 60                            | 0 | 1 | 60                            | 0 | 1 | 60                            | 0   | 1 | 60                            | 0  | 1 |
| 72                            | 0 | 1 | 72                            | 0 | 1 | 72                            | 0   | 1 | 72                            | 0  | 1 |
| 84                            | 0 | 1 | 84                            | 0 | 1 | 84                            | 0   | 1 | 84                            | 0  | 1 |
| 96                            | 0 | 1 | 96                            | 0 | 1 | 96                            | 0   | 1 | 96                            | 0  | 1 |
| 108                           | 0 | 1 | 108                           | 0 | 1 | 108                           | 0   | 1 | 108                           | 0  | 1 |
| 120                           | 0 | 1 | 120                           | 0 | 1 | 120                           | 0   | 1 | 120                           | 0  | 1 |
| 132                           | 0 | 1 | 132                           | 0 | 1 | 132                           | 0   | 1 | 132                           | 0  | 1 |
| 144                           | 0 | 1 | 144                           | 0 | 1 | 144                           | 0   | 1 | 144                           | 0  | 1 |
| 156                           | 0 | 1 | 156                           | 0 | 1 | 156                           | 0   | 1 | 156                           | 0  | 1 |
| 168                           | 0 | 1 | 168                           | 0 | 1 | 168                           | 0   | 1 | 168                           | 0  | 1 |
| 180                           | 0 | 1 | 180                           | 0 | 1 | 180                           | 0   | 1 | 180                           | 0  | 1 |
| 192                           | 0 | 1 | 192                           | 0 | 1 | 192                           | 100 | 0 | 192                           | 0  | 1 |
| 204                           | 5 | 0 | 204                           | 0 | 1 | 204                           | 200 | 0 | 204                           | 3  | 1 |
| 216                           | 7 | 0 | 216                           | 4 | 1 | 216                           | 480 | 0 | 216                           | 52 | 0 |
|                               |   |   | 228                           | 7 | 0 |                               |     |   | 228                           |    | 0 |

Anexo 23: Tabla 20 Formulación pan libre de gluten

|                        | LP FST 1.7 <sup>a</sup> | LS 1.52 <sup>b</sup> | CA <sup>c</sup> | NA <sup>d</sup> |
|------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------|-----------------|
| Brown rice flour       | 400                     | 400                  | 500             | 500             |
| Corn starch            | 864                     | 864                  | 1080            | 1,080           |
| Buckwheat              | 136                     | 136                  | 170             | 170             |
| Soya flour             | 200                     | 200                  | 250             | 250             |
| Yeast, dried           | 30                      | 30                   | 30              | 30              |
| Xanthan gum            | 25                      | 25                   | 25              | 25              |
| Salt                   | 35                      | 35                   | 35              | 35              |
| Sugar syrup            | 25                      | 25                   | 25              | 25              |
| Sugar                  | 20                      | 20                   | 20              | 20              |
| Water                  | 1,700                   | 1,700                | 2100            | 2,100           |
| Acid mix <sup>e</sup>  | —                       | —                    | 12.74           | —               |
| Sourdough <sup>f</sup> | 800                     | 800                  | —               | —               |
| Total water            | 2,100                   | 2,100                | 2100            | 2,100           |

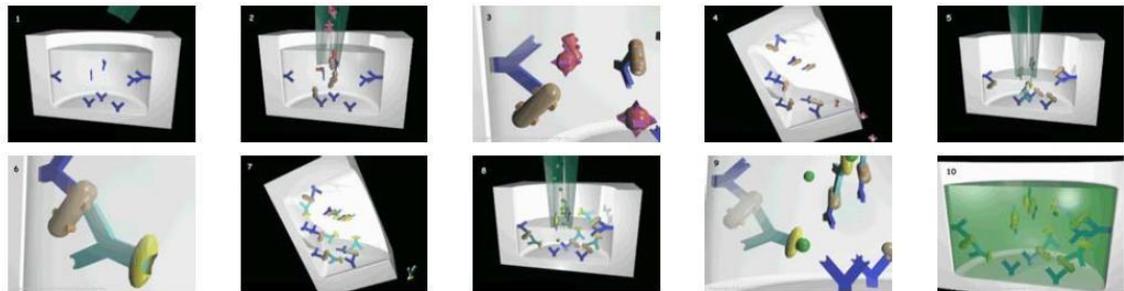
Fuente: (M. M. Moore, 2008)

Anexo 24: Tabla 21 Crecimiento bacteriano en masas acidas con 4 tipos de inoculación de lactobacillus.

| Bread                             | T (°C) | 24 h               |       | 48 h               |       | 72 h               |       | 96 h               |       |
|-----------------------------------|--------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|
|                                   |        | Degree of spoilage | Odour |
| Control (without sourdough)       | RT     | –                  | No    | –                  | No    | –                  | No    | I                  | Yes   |
|                                   | 30     | –                  | No    | –                  | No    | –                  | No    | I                  | Yes   |
| Two-strain starter sourdough 10%  | RT     | –                  | No    | –                  | No    | –                  | No    | I                  | Yes   |
|                                   | 30     | –                  | No    | –                  | No    | –                  | No    | I                  | Yes   |
| Two-strain starter sourdough 15%  | RT     | –                  | No    | –                  | No    | –                  | No    | –                  | No    |
|                                   | 30     | –                  | No    | –                  | No    | –                  | No    | –                  | No    |
| Four-strain starter sourdough 10% | RT     | –                  | No    | –                  | No    | –                  | No    | –                  | No    |
|                                   | 30     | –                  | No    | –                  | No    | –                  | No    | –                  | No    |
| Four-strain starter sourdough 15% | RT     | –                  | No    | –                  | No    | –                  | No    | –                  | No    |
|                                   | 30     | –                  | No    | –                  | No    | –                  | No    | –                  | No    |

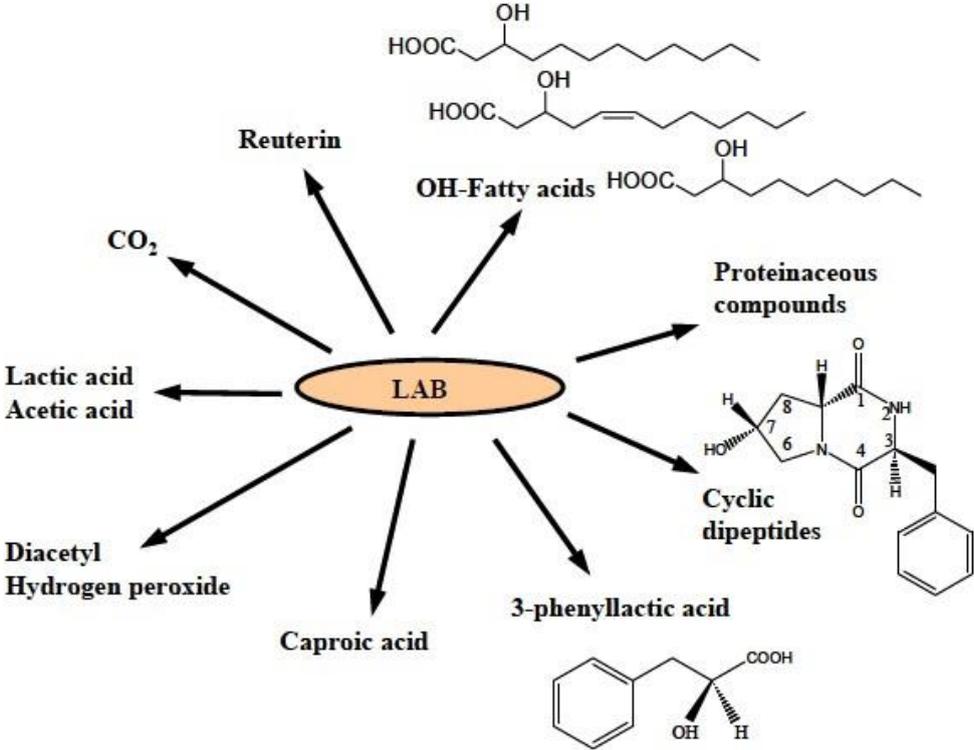
Fuente: (Rositsa Denkovaa, 2014)

Anexo 25: Ilustración 28 Fundamento Análisis ELISA



Fuente: (Cultek, 2006)

Anexo 26: Compuestos anti fúngicos producidos por bacterias ácido lácticas



Fuente: (Magnusson, 2003)

