

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Desarrollo de masas madre y evaluación de propiedades reológicas y tecnológicas de panificados

Tesinista: Romina Paola Lancetti

Firma:

Director: Emiliano Salvucci

Firma:

Codirector: Lorena Sciarini

Firma:

Lugar de trabajo: Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba (ICYTAC)
Córdoba, Marzo de 2017



Desarrollo de masas madre y evaluación de propiedades reológicas y tecnológicas de panificados

TRIBUNAL EXAMINADOR:

- **Dr. Abel López**
- **Dra. Diana Labuckas**
- **Dra. Anahí Turina**

Firma:

Firma:

Firma:

Calificación:

Fecha:

INDICE

AGRADECIMIENTOS	5
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Cepas de Bacterias Lácticas y cultivos <i>in vitro</i>	14
Preparación de masas madre (sourdough)	15
Análisis microbiológicos	15
Medición de pH y Acidez Total Titulable (ATT)	16
Perfil de azúcares	16
Determinación de compuestos volátiles	17
Evaluación de la capacidad proteolítica	17
Evaluación de las propiedades reológicas de las masas	18
Panificación	20
Evaluación de la calidad tecnológica de los panes	21
Estructura de la miga	23
Análisis estadístico	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
Análisis microbiológicos, determinación de pH y acidez total titulable (ATT).	25
Perfil de azúcares	26
Determinación de compuestos volátiles	29
Evaluación de la capacidad proteolítica	33
Aplicación de las cepas estudiadas en productos de panificación	34
Evaluación de las propiedades reológicas de las masas	34

Evaluación de la calidad tecnológica de los panes	38
CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba (ICYTAC) y al Laboratorio de Microbiología de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Exactas, por brindarme la posibilidad y el espacio para poder desarrollar mi tesina de grado.

A mis directores, Emiliano y Lorena, por aceptarme para llevar a cabo este trabajo, gracias por su paciencia y confianza.

Al tribunal por su tiempo y dedicación en la corrección de mi trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio, por estar siempre alentándome.

A mis amigos de toda la vida y a mis amigas que me dio la carrera, que sin ellos creo que no hubiese podido llegar hasta donde llegué.

A mi familia, por apoyarme y estar siempre en todo momento.

Mi agradecimiento eterno a mis padres, por haberme dado la posibilidad de estudiar y por haber estado en esos momentos donde el camino se hacia un poco complicado.

Y por último, a mi hermana, compañera de vida y gran consejera, que estuvo siempre dispuesta a ayudarme y acompañarme en este trayecto.

INTRODUCCIÓN

El pan es un alimento básico en muchas culturas en todo el mundo y es uno de los primeros alimentos elaborados por la humanidad. La fórmula básica y ancestral para obtener masa para su elaboración es una mezcla de harina, agua, sal y un agente leudante en proporciones relativamente variables. Los productos de panificación, como panes, galletitas y pastas, se encuentran entre los de consumo más extendido y, en general, se elaboran utilizando harinas de trigo. Globalmente, el trigo (*Triticum spp*) es uno de los cereales más cultivados y uno de los más consumidos por el hombre en la civilización occidental desde la Antigüedad. Este cereal fue uno de los primeros granos cultivados, localizándose inicialmente en el Oriente Medio hace unos 10.000 años (Gómez Pallarés y col., 2007). Anualmente en Argentina se industrializan alrededor de 3,8 millones de toneladas de harina de trigo. El producto se industrializa y consume de diferentes maneras: 71,3% para la elaboración de pan en panaderías artesanales, 8,6% para pastas, 8,1% para consumo como harina fraccionada y otros, 7,3% para galletitas y 4,7% para pan industrial (Lezcano, 2006).

La harina obtenida del grano del trigo es la única que cuenta con la habilidad de formar, con el agregado de agua, una masa cohesiva y elástica capaz de retener gases (CO₂) durante la fermentación y dar productos aireados y livianos después de su horneado. Esta habilidad está dada por la capacidad que tienen las proteínas de reserva del trigo para formar una red continua –llamada red de gluten. Osborne, en 1907, clasificó a las proteínas de los cereales de acuerdo a su solubilidad en cuatro tipos: albúminas, solubles en agua; globulinas, solubles en soluciones salinas diluidas; prolaminas, solubles en alcohol al 70%; y glutelinas, sólo solubles en ácidos diluidos. Estas últimas también pueden ser solubilizadas en bases diluidas y detergentes. Los dos primeros grupos pertenecen a las proteínas metabólicamente activas, y se ubican en el citoplasma celular. Las prolaminas (que en el trigo reciben el nombre particular de gliadinas) y glutelinas (que en trigo se denominan gluteninas) comprenden las proteínas de almacenamiento, las cuales conforman la mayoría de las proteínas presentes en el gluten. Estas se encuentran en el endosperma del grano formando los llamados *cuerpos proteicos* que, al madurar la semilla, se comprimen unos a otros formando una *matriz proteica* (Hoseney, 1994). Durante el amasado se produce la ruptura de estos cuerpos y su hidratación, formando una red proteica

tridimensional continua (llamada *red de gluten*) en la cual se encuentra embebido el almidón. Las propiedades reológicas de la masa están gobernadas por las características de las proteínas que forman esta red. Así, las gliadinas son proteínas monoméricas responsables de la viscosidad del gluten, constituyendo un tercio de las proteínas de la harina (Lindahl, 1990). Las gluteninas se encuentran formando grandes agregados proteicos, unidos por puentes disulfuro y fuerzas no covalentes intermoleculares, que determinan la fuerza y la elasticidad del gluten. A las gluteninas, sobre todo a las de alto peso molecular, se les asigna la capacidad de producir una matriz elástica y extensible.

Además del gluten, se destacan por su importancia funcional, las enzimas. En el grano intacto, seco y no germinado la actividad enzimática total es muy baja, pero cambia drásticamente cuando comienza la germinación. Las enzimas que han recibido mayor atención son las que digieren el almidón. El trigo contiene aproximadamente un 60-70% de almidón. La degradación del almidón en la masa es primordial como fuente de carbohidratos fermentables y azúcares reductores. Los granos de trigo contienen actividades de α -amilasa, β -amilasa y glucoamilasa (Belitz y col., 2004; Brandt, 2006). Las amilasas son enzimas que hidrolizan los polisacáridos contenidos en los gránulos de almidón. Pueden clasificarse como endohidrolasas, que atacan los enlaces glucosídicos dentro de las moléculas de polisacáridos y exohidrolasas, que atacan los enlaces glucosídicos en o cerca del final de las cadenas. La más importante del tipo endohidrolasa es α -amilasa, la cual hidroliza enlaces α -1,4-glucosídicos y produce una mezcla de maltodextrinas, maltosa y glucosa (Röcken y Voysey, 1995; Brandt, 2006). Su pH óptimo es de aproximadamente 5. El otro tipo principal de amilasa es la β -amilasa, una exohidrolasa, que rompe enlaces α -1,4-glucosídicos cerca de los extremos no reductores del almidón para producir maltosa y su pH óptimo es similar al de la α -amilasa. Ambos tipos existen en múltiples formas o isoenzimas con diferentes propiedades químicas y físicas. El resultado de esta actividad enzimática es una concentración de hidratos de carbono fermentables relativamente baja. Los mono y disacáridos se encuentran en el grano en muy pequeñas cantidades: fructosa 0,06%, glucosa 0,08%, galactosa 0,02%, sacarosa 0,54% y maltosa 0,05% (porcentajes de materia seca). Los oligosacáridos, como la rafinosa (0,19%) también se encuentran en proporciones muy bajas (Hoseney 1994, Matz 1999). Es por esto que, las harinas deben presentar una adecuada combinación de α y β -amilasas para obtener

azúcares que servirán de sustrato en la fermentación y la generación de CO₂ consiguiente. Una actividad enzimática baja se traduce en panes con poco volumen, debido a la falta de sustrato para la fermentación, y con menor color, debido a la menor cantidad de azúcares reductores que participan en las reacciones de Maillard y caramelización. Por el contrario, las masas con elevadas actividades enzimáticas, propias de harinas procedentes de trigos germinados, producen panes muy oscuros y con migas muy gomosas debido a la excesiva producción de dextrinas.

Uno de los primeros procesos biotecnológicos aplicados al proceso panificación, que contribuyó de manera notable a la mejora de la calidad del pan, es el de masas madre (*sourdough*). Este proceso consiste en dejar fermentar por un periodo de tiempo relativamente largo (típicamente 24 horas) a temperatura moderada, una mezcla de harina con agua. Luego, y con fines prácticos, de esa misma mezcla se deja una porción de masa para generar la fermentación de las masas posteriores, de ahí su nombre.

La primera evidencia de la elaboración de pan está fechada alrededor del año 1500 a.C en murales pintados por los egipcios (Von Stokar, 1956; Corsetti y col., 2007) aunque el pan de masa madre formó parte de la dieta europea desde hace 5000 años (Wahren, 1985). En la actualidad, la masa madre se emplea en la fabricación de una variedad de productos como panes, pasteles y galletas saladas, y su aplicación se encuentra en aumento (Ottogalli, Galli y Foschino, 1996; Foschino, Terraneo, Mora y Galli, 1999; Vogel y col., 1999; De Vuyst y Ganzle, 2005) Uno de los países que se destaca por su uso para la producción panadera es Italia (Ottogalli y col., 1996) donde, se pueden encontrar más de 200 tipos diferentes de panes de masa fermentada.

Desde el punto de vista microbiológico, el estudio de masa madre apenas comenzó hace cien años (Salovaara, 1998). La misma se describe como una masa cuyas características típicas se deben principalmente a su microbiota, representada básicamente por bacterias lácticas (LAB) y levaduras (Tabla 1). Las bacterias más relevantes aisladas de masa fermentada pertenecen al género *Lactobacillus* (Stolz, 2003). Las especies más comunes encontradas son *L. acidophilus*, *L. farciminis*, *L. delbrueckii* (homofermentativas obligadas, fermentan hexosas para producir principalmente ácido láctico), *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* (heterofermentativas facultativas), *L. brevis*, *L. sanfransicensis* y *L. fermentum* (heterofermentativas obligadas) (Salovaara, 2004). Las heterofermentativas

facultativas o heterofermentativas obligadas también pueden fermentar pentosas para producir ácido láctico, ácido acético y etanol. Es por esto que, la formación de productos finales por parte de cepas de bacterias lácticas de metabolismo heterofermentativo depende de las condiciones del procesamiento de la masa madre y del tipo de cepa que la conforma. (Figura 1) (Röcken y col., 1992).

Tabla 1. Bacterias ácido lácticas generalmente asociadas y encontradas en fermentaciones de masa madre.

Bacterias ácido lácticas (LAB)			Levaduras
Heterofermentativas obligadas*	Heterofermentativas facultativas	Homofermentativas obligadas	
<i>L. acidifarinae</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>E. casseli fl avus</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i>
<i>L. brevis</i>	<i>L. casei/paracasei</i>	<i>E. durans</i>	<i>Candida milleri</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>L. coleohominis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>L. kimchi</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Hansenula anómala</i>
<i>L. collinoides</i>	<i>L. paralimentarius</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>Pichia saitoi</i>
<i>L. crustorum</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. amylolyticus</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
<i>L. Curvatus</i>	<i>L. perolens</i>	<i>L. amylovorus</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>L.fermentum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. crispatus</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>
<i>L.fructivorans</i>	<i>L. sakei.</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp.	
<i>L. frumenti</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>delbrueckii</i>	
<i>L. hammesii</i>	<i>P. dextrinicus</i>	<i>L. farciminis</i>	
<i>L. hilgardii</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>L. gallinarum</i>	
<i>L. homohiochii</i>		<i>L. gasseri</i>	
<i>L. kefir</i>		<i>L. helveticus</i>	
<i>L. kunkeei</i>		<i>L. johnsonii</i>	
<i>L.lindneri</i>		<i>L. mindensis</i>	
<i>L. mucosae</i>		<i>L. nagelii</i>	
<i>L. Namurensis</i>		<i>L. salivarius</i>	
<i>L.nantensis</i>		<i>Lc. lactis</i> subsp . <i>lactis</i>	
<i>L.Nodensis</i>		<i>S. constellatus</i>	
<i>L.oris</i>		<i>S. equinus</i>	
<i>L. panis</i>		<i>S. suis</i>	
<i>L. parabuchneri</i>			
<i>L. pontis</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rossiae</i>			
<i>L. sanfranciscensis</i>			

<i>L. secaliphilus</i>			
<i>L. siliginis</i>			
<i>L. spicheri</i>			
<i>L. vaginalis</i>			
<i>L. zymae</i>			
<i>Le. citreum</i>			
<i>Le. gelidum</i>			
<i>Le. mesenteroides</i> subsp			
<i>.cremoris</i>			
<i>Le. mesenteroides</i> subsp			
<i>.dextranicum</i>			
<i>Le. mesenteroides</i> subsp			
<i>.mesenteroides</i>			
<i>W. cibaria</i>			
<i>W. confusa</i>			
<i>W. hellenica</i>			
<i>W. kandleri</i>			
<i>W. paramesenteroides</i>			
<i>W. viridescens</i>			

E. Enterococcus, L. Lactobacillus, Lc. Lactococcus, Le. Leuconostoc, P. Pediococcus, S. Streptococcus, W. Weissella. *Clasificación de los tipos de fermentación de la glucosa en LAB de acuerdo a Felis y Dellaglio. Adaptado de De Vuyst y Neysens, (2005); Corsetti, (2007).

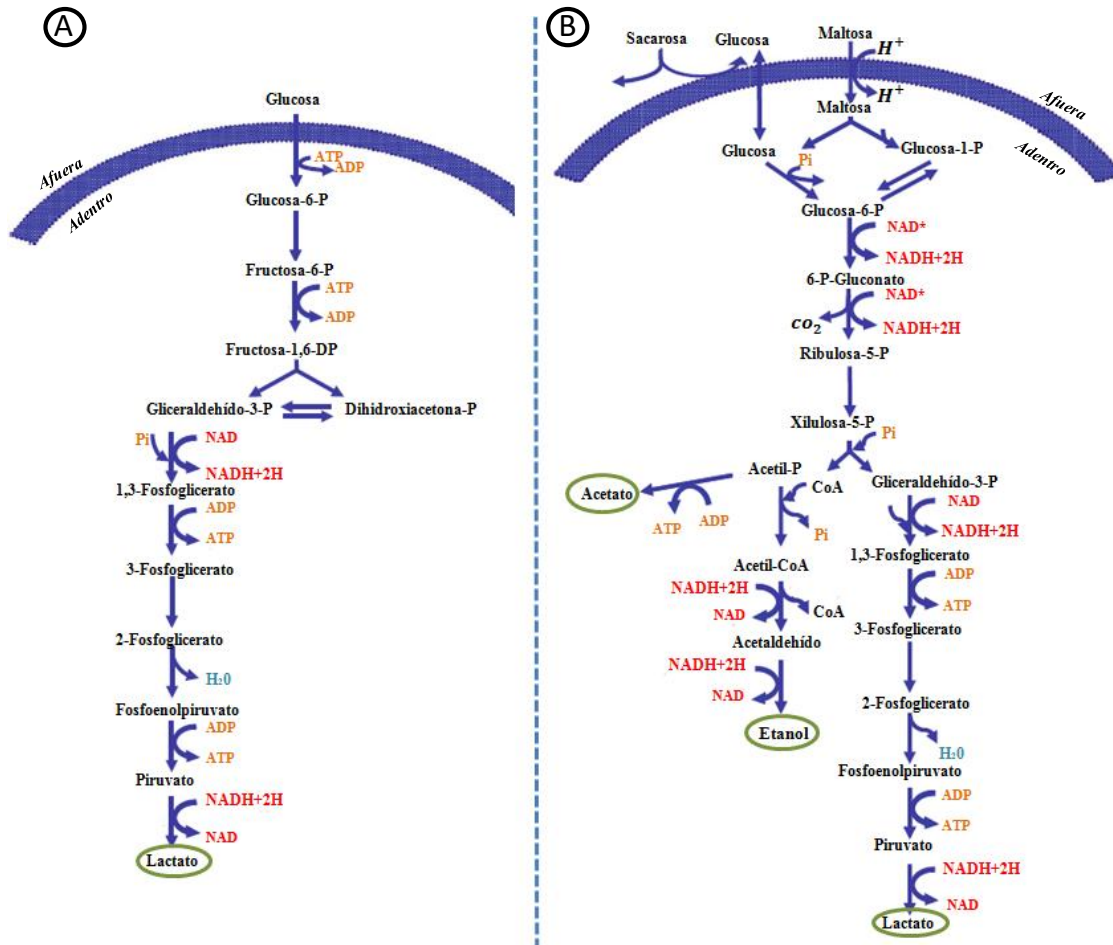


Figura 1. Fermentación láctica. A: metabolismo homofermentativo; B: metabolismo heterofermentativo (Gänzle y Gobbetti, 2013).

Debido a esta comunidad microbiana, la masa es metabólicamente activa y puede mantenerse mediante repiques sucesivos o *backslopping* manteniendo una comunidad microbiana estable (Vrancken, 2011). Dado que la harina no puede ser sometida a esterilización por calor (ya que se produciría la pérdida de su capacidad tecnológica), la aparición y el número de ciertos tipos de microorganismos autóctonos de la harina dependerá estrictamente de una combinación de sustratos disponibles y parámetros tecnológicos específicos (Salovaara, 1998).

De acuerdo a su tipo de conservación, podemos diferenciar tres tipos de masas madre: las masas madre Tipo I (o masas madre tradicionales) son mantenidas a diario mediante repique continuo (o refrescos), a temperatura ambiente (<30 °C), para mantener a los microorganismos en un estado activo. Estas producciones a pequeña escala se utilizan

en la elaboración tradicional de pan de masa madre (Böcker y col., 1995; Hammes y Gänzle, 1998). Las masas madre naturales con frecuencia albergan a *Lactobacillus sanfranciscensis* y levaduras como *Candida humilis* y *Kazachstania exigua*. Las masas madre Tipo II, o industriales, se producen a través de procesos de propagación de un solo paso de larga duración (típicamente 2-5 días) a una temperatura de fermentación por encima de 30 °C y con alto contenido de agua. Estas grandes producciones de masa fermentada resultan en preparaciones semifluidas que se utilizan como masa acidificada; *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus pontis* y *Lactobacillus reuteri* se encuentran comúnmente en masas madre tipo II de trigo y centeno. Las masas madre tipo III se preparan en forma seca para ser utilizadas como suplemento acidulante y portadores de sabor para la producción de pan (Hammes y Gänzle, 1998). A diferencia de las Tipo I, las masas tipo II y III requieren la adición de levadura comercial.

Durante la fermentación de la masa, las bacterias lácticas asociadas a los cereales producen ácidos láctico y acético, disminuyendo el pH por debajo de 5, y las levaduras producen CO₂ y etanol. Estas condiciones contribuyen a la activación de las enzimas presentes, cuya acción resulta beneficiosa a la hora de obtener panes. En panes de trigo y centeno, se sabe que esta técnica mejora su volumen, textura, sabor, valor nutricional y prolonga su vida de anaquel al demorar el fenómeno de envejecimiento y al proteger al pan del ataque de hongos y bacterias (Gobbetti, 1998; De Vuyst y Vancanneyt, 2007; Gänzle y col., 2008). Aunque el procedimiento de masas madre cayó en desuso hacia finales del siglo XIX, al ser reemplazado por tecnologías más cortas que reducían los costos de producción, en la última década se ha vuelto a su empleo, dados los beneficios mencionados anteriormente.

La fermentación microbiana en la masa madre, genera cambios importantes en la composición de hidratos de carbono. La interacción con levaduras y el metabolismo de cada cepa de bacteria láctica determina el consumo de carbohidratos (Paucean y col., 2013). *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus reuteri*, están altamente adaptados a la fermentación de maltosa (Figura 2) que es el principal azúcar disponible en harinas de trigo (Gobbetti y col., 2005; Gänzle y col., 2007). El metabolismo de la maltosa es preferible en estos microorganismos sobre el metabolismo de otras fuentes

de carbono, o se produce simultáneamente (Stolz y col., 1993; Ehrmann and Vogel, 1998; Gobetti y col., 2005).

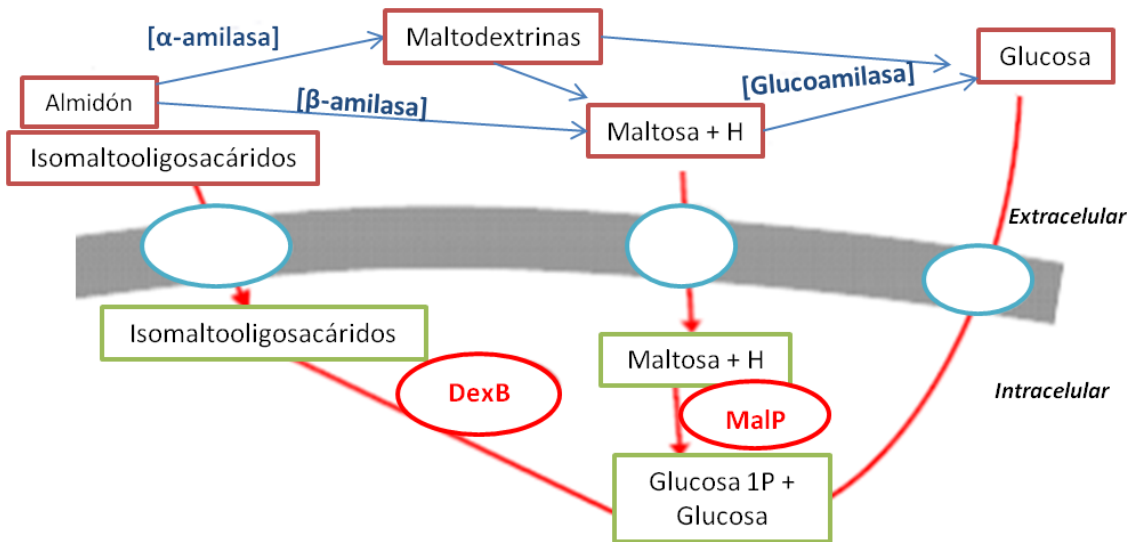


Figura 2. Hidrólisis del almidón por parte de las enzimas de la harina y metabolismo de maltosa por parte de las bacterias lácticas. Las harinas de trigo exhiben una actividad α , β y glucoamilásica liberando maltodextrinas, maltosa y glucosa, respectivamente, desde el almidón durante la fermentación de masa madre. Amilasas son inhibidas por acidificación a $\text{pH} < 4,5$. Los organismos clave en sourdough, incluyendo *L. sanfranciscensis*, *L. reuteri* y *L. fermentum*, albergan maltosa fosforilasa (MalP) y 1,6- α -glucosidasa (DexB) como enzimas glucanhidrolizantes únicas. Adaptado a partir de Belitz y col., 2004; Brandt, 2006; Gänzle y Follador, 2012.

Otros azúcares producidos durante la fermentación son las dextrinas, azúcares de bajo peso molecular con grado de polimerización (GP) 3-7, los cuales parecen desempeñar un papel importante en la calidad del pan al interferir su envejecimiento (Martin y Hosene, 1991). Durante el almacenamiento, la textura del pan se hace más dura, mayormente debido a los cambios físicos que ocurren en la matriz de almidón-proteína de la miga de pan (Gray y Bemiller, 2003). La retrogradación es el proceso mediante el cual el almidón vuelve a una forma más cristalina después del horneado (Goesaert, 2005). El papel significativo de las enzimas producidas por las bacterias lácticas (BAL) ha sido propuesto para explicar las diferencias observadas en el envejecimiento de los panes de masa fermentada. Los panes de masa madre con niveles de acidez comparables presentan disminución en las tasas de

envejecimiento variables en términos de firmeza y retrogradación del almidón. Esto estaría explicado, ya que, las cepas que poseen actividades proteolíticas y amilolíticas son más eficientes en el retraso del envejecimiento del pan (Corsetti y col., 1998; Corsetti y col., 2000).

Además de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP, cepas heterofermentativas facultativas) y vía de fosfogluconato (cepas hetero-fermentativas obligadas), el uso de aceptores de electrones externos o fuentes de energías alternativas y las interacciones entre enzimas endógenas y exógenas conducen a diferentes cocientes de la fermentación (relación molar entre ácidos láctico y acético) que afecta el sabor de los productos horneados (Gobbetti y col., 2000; Di Cagno y col., 2002; Gänzle y col., 2007; Nionelli y Rizzello, 2016). Como consecuencia de la fermentación hay un gran aumento de los aminoácidos libres. Las BAL contribuyen a la proteólisis general durante la fermentación creando condiciones óptimas para la actividad de las proteinasas de cereales (Thiele y col., 2002), y así depende en gran medida de la formación de ácidos. La proteólisis durante la fermentación de masa fermentada incluye la hidrólisis de proteínas a polipéptidos de tamaño intermedio y posterior liberación de aminoácidos libres por peptidasas bacterianas. Los aminoácidos y péptidos son importantes precursores para los compuestos volátiles del sabor al ser utilizados como sustratos para las conversiones microbianas o debido a su conversión en compuestos sápidos durante la cocción (Thiele y col., 2002; De Angelis y col., 2002; Nionelli y Rizzello, 2016). Dentro del catabolismo de aminoácidos libres, la expresión de la arginina deiminasa (ADI) en BAL mejora el crecimiento y la tolerancia al estrés ácido. También aumenta la síntesis de ornitina, precursor de la 2-acetil – pirrolina que es responsable de la nota tostado de la corteza de pan de trigo (De Angelis y col., 2002). En consecuencia, un limitado grado de proteólisis durante la fermentación mejora el sabor del pan (Gassenmeier y Schieberle, 1995; Thiele y col., 2002). El nivel de aminoácidos presentes en las masas de trigo depende del pH de la masa, el tiempo de fermentación y el consumo de aminoácidos por la microbiota fermentativa (Thiele y col., 2002).

Entre los compuestos que tienen un papel clave en la formación del sabor en productos horneados se destacan en cepas homofermentativas el diacetilo, acetaldehído, y hexanal, mientras que en las cepas heterofermentativas el acetato de etilo, alcoholes y

aldehídos. Las bacterias con alta actividad proteolítica contribuyen a la hidrólisis de proteínas de trigo de una manera específica dependiente de cada cepa (Di Cagno y col., 2003). El estudio de la actividad proteolítica también es importante para reducir alergenicidad en el desarrollo de alimentos libres de gluten y para la producción de compuestos bioactivos que ejerzan un efecto beneficioso en la salud del consumidor, ya que aumenta la biodisponibilidad de micronutrientes y antioxidantes (Katina y Poutanen, 2013).

En resumen, el proceso de masa madre depende de numerosos factores incluyendo, entre otros, la composición de la microbiota, los parámetros de fermentación, las actividades enzimáticas, la composición química y física de la harina, tiempo de refrescos y número de pasos de propagación, rendimiento de la masa e interacción entre los microorganismos (De Vuyst y col., 2005) (Figura 3). Así, la acción simultánea de estos elementos define parámetros tales como producción de acidez, la formación de compuestos volátiles, y la degradación de compuestos de carbono y nitrógeno (Martínez-Anaya, 1996b). El nivel e intensidad de estas modificaciones durante la fermentación, determinan la calidad subsiguiente del pan.

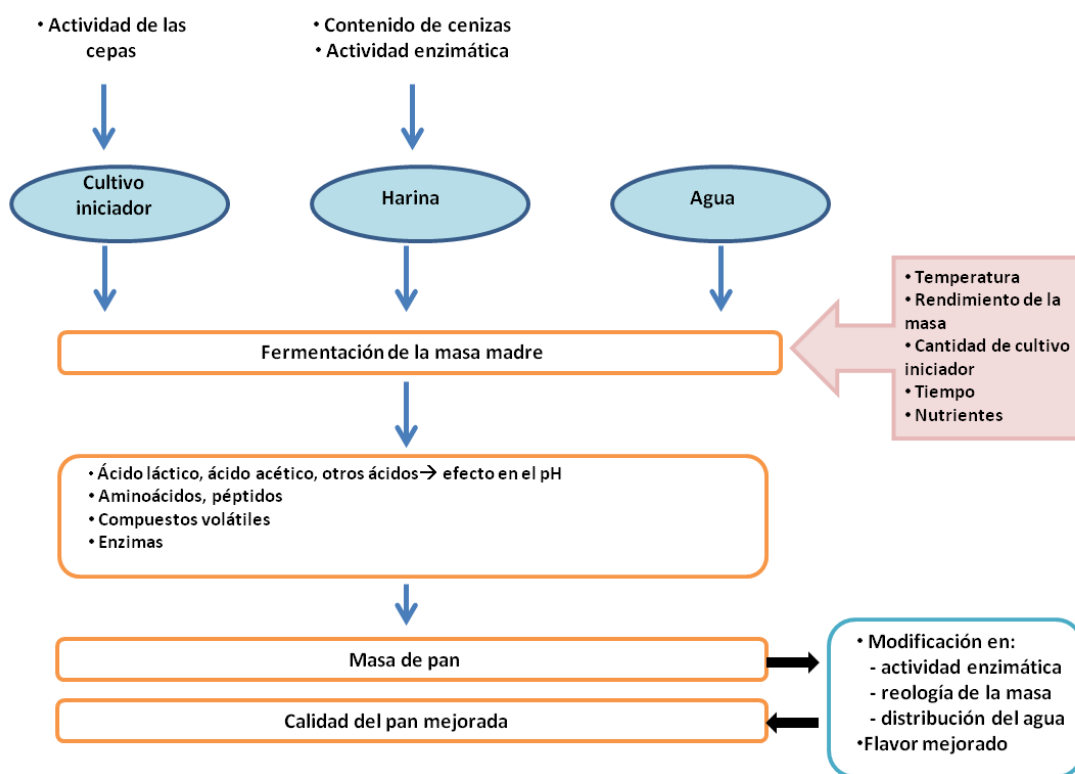


Figura 3. Fermentación de masa madre y factores de influencia. Adaptado a partir de Katina, 2005.

Es por todo lo expuesto, que en el presente trabajo se pretende evaluar el efecto de un grupo de cepas de bacterias lácticas aisladas de cereales y semillas como cultivo iniciador para masas madre y el efecto de las mismas en las propiedades reológicas y tecnológicas de panificados.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar diferentes cultivos iniciadores de bacterias lácticas en la elaboración de masas madre y su efecto sobre el comportamiento de la masa panaria y la calidad tecnológica de panes de trigo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar propiedades de las cepas empleadas en la elaboración de masas madre en términos de capacidad proteolítica, producción de volátiles y perfil de azúcares de las mismas.
2. Estudiar el efecto de masas madre obtenidas mediante fermentación con las diferentes cepas sobre las propiedades reológicas de masas de trigo.
3. Evaluar la calidad tecnológica de los panes elaborados con las diferentes masas madre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de Bacterias Lácticas y cultivos *in vitro*

Se utilizaron cepas previamente aisladas en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba (ICYTAC) aisladas de cereales y semillas (Salvucci y col., 2016) (Tabla 2). Se utilizó, además, la cepa de referencia *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 como cultivo iniciador control. Las cepas heterofermentativas fueron propagadas en medio de cultivo Man Rogosa Sharpe (MRS) (De Man y col., 1960) y las de carácter homofermentativo en medio LAPTg (Raibaud y col., 1961). Para los medios agarizados se agregó 1,5% de agar.

Composición de los medios de cultivo:

- LAPTg: Peptona 15 g, triptona 10 g, extracto de levadura 10 g, glucosa 10 g, Tween 80 1 g, agua destilada csp. 1000 ml. pH 6,5.
- MRS: Peptona 10 g, extracto de carne 10 g, extracto de levadura 5 g, glucosa 20 g, Tween 80 1 g, K₂HPO₄ 2 g, acetato de sodio 5 g, citrato triamónico 2 g, MgSO₄.7H₂O 0,2 g, MnSO₄.4H₂O 0,05 g, agua destilada csp. 1000 ml.

Tabla 2. Cepas empleadas en la elaboración de masas madre.

Cepas a utilizar	Origen	Características	Tipo de fermentación
<i>Enterococcus faecium</i> 74	Sésamo	Proteólisis de gelatina – Acidificante	Homoláctica
<i>Pediococcus acidilactici</i> 22	Avena	Producción de folato (55,8 ng/mL)	Homoláctica
<i>Lactobacillus pentosus</i> 124	Sourdough	Producción de folato (61,8 ng/mL) - Acidificante (pH 3,3 en 8 h en extracto de harina de trigo)	Heteroláctica
<i>Lactobacillus fermentum</i> 148	Sourdough	Proteólisis de gelatina – Acidificante	Heteroláctica
<i>Lactobacillus brevis</i> 253	Sourdough	Acidificante	Heteroláctica
<i>Lactobacillus plantarum</i> 137	Sourdough	Producción de folato (57 ng/mL)	Heteroláctica
<i>Lactobacillus fermentum</i> 142	Sourdough	Acidificante	Heteroláctica
<i>Lactobacillus plantarum</i> 147	Sourdough	Especie común en sourdoughs – Acidificante	Heteroláctica
<i>Lactobacillus paralimentarium</i> 259	Sourdough	Especie común en sourdoughs – Acidificante (pH<4 en 8hs)	Heteroláctica
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	Intestino	Acidificante – Producción de Ac. láctico – Ceba de referencia	Heteroláctica

Preparación de masas madre (sourdough)

Se utilizó una harina de trigo comercial para panificación. La preparación de masas madre incluye una proporción agua:harina de 1:1, para producir un rendimiento de masa de 100 (peso de masa/ peso de harina x 100). El inóculo de las cepas de bacterias lácticas fue de 1×10^8 UFC/g. Se mezclaron las masas manualmente y se mantuvieron a 30 °C durante 24 h para obtener la masa madre. El control fue realizado de la misma manera pero sin el agregado del inóculo de microorganismos.

Análisis microbiológicos

Para el recuento de bacterias lácticas, se homogeneizaron 10 g de la muestra de masa madre con 90 mL de solución fisiológica NaCl 0,9% (p/v) esterilizada. Se realizaron diluciones decimales seriadas y se efectuó el método de recuento en placa utilizando medio MRS agar seguido de incubación a 37 °C por 48 h.

Medición de pH y Acidez Total Titulable (ATT)

La medición del pH de las distintas masas se realizó empleando un pH-metro TESTO 205 (Lenzkirch, Alemania), para compuestos semisólidos.

Para determinar la ATT se pesaron 2 g de masa madre en un erlenmeyer de 100 mL de capacidad, y se mezclaron con 20 mL de agua destilada. A esta suspensión se le agregó como indicador 4 gotas de fenolftaleína (2,5% p/v en etanol). Se utilizó como solución de valoración NaOH 0,1 M.

Perfil de azúcares

Se realizaron masas madre, todas por duplicado, de las distintas cepas lácticas con el fin de determinar el perfil de azúcares. Las mismas fueron incubadas durante 24 h a una temperatura de 30 °C, y una masa con el mismo procedimiento pero sin inóculo, fue utilizada como control. Luego de la fermentación, se procedió a realizar el método de Carrez (Lefebvre, 2002), el cual permite separar los azúcares del resto del contenido de la masa. Este método es muy efectivo, ya que la proteína residual luego de la extracción es muy baja, más del 98% de la proteína inicial es descartada por medio de esta técnica (Lefebvre, 2002). Brevemente, se homogeneizaron 400 mg de masa madre con 1460 mL de agua miliQ. A cada muestra se le agregaron 200 µL de la solución de Carrez I (hexacianoferrato de potasio, 0,085 M) y se lo dejó actuar por 1 minuto. Luego, se agregó la solución de Carrez II (sulfato de zinc, 0,25 M) por 5 minutos. Por último, se centrifugó a 7500 rpm por 30 minutos y se extrajo el sobrenadante descartando el precipitado. Se realizó una masa control elaborada en el momento que sirvió como control a tiempo inicial (0 h).

Para el análisis de azúcares se utilizó un cromatógrafo líquido de alto rendimiento (HPLC), equipado con una columna Supelcogel Ca (300 x 7,8 mm) (Sigma-Aldrich, Pensilvania, EUA) y un detector de índice de refracción (10A Shimadzu, Kyoto, Japón). Se inyectó un volumen de 20 µL, y se empleó agua desionizada como fase móvil, a un flujo de 0,5 mL/min y una temperatura de columna de 80 °C. Para la identificación de los azúcares se utilizó la tabla que trae la columna donde se registra cada compuesto a los distintos tiempos de retención.

Determinación de compuestos volátiles

Para analizar los compuestos volátiles de masa madre en los viales de muestra se realizó extracción en fase sólida (SPME) y cromatografía gaseosa (CG), la cual se llevó cabo utilizando un sistema CP-3800 (Varian, Palo Alto, EUA) con un detector Saturn 2200 (Varian, Palo Alto, EUA), inyector automático PAL (Varian, Palo Alto, EUA) con una columna Agilent HP5MS 30m x 0,25 mm (Santa Clara, EUA). Se utilizó una fibra de divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano 50/30 mm (Sigma-Aldrich, Pensilvania, EUA). Se realizó una extracción de 20 minutos a 30 °C utilizando 2g de masa madre de cada cepa y un control 24 h, todo por duplicado. Los volátiles adsorbidos sobre la fibra de SPME pasan a la fase de desorción por un período de 30 segundos a 260 °C. Se usó helio (1,7 mL/min) como gas portador, y el inyector estaba en modo sin división durante 10 min utilizando un revestimiento de entrada de 0,75 mm de diámetro interno. La temperatura del detector fue de 200 °C, y para la ionización se utilizó energía de electrones de 70 eV. La temperatura de la columna se mantuvo inicialmente a 35 °C durante 3 minutos después de la inyección antes de incrementar a 155 °C a una velocidad de 7°C/min y 280°C a una velocidad de 45°C/min con un tiempo total de corrida de 22,92 min.

Los compuestos volátiles se identificaron tentativamente comparando sus espectros e índices de retención con los presentes en la biblioteca NIST05 (NIST, Gaithersburg, MD, EUA).

Evaluación de la capacidad proteolítica

Para evaluar la capacidad de las distintas cepas para hidrolizar las proteínas solubles en agua de la harina de trigo, se extrajeron las proteínas solubles en buffer fosfato. Para tal fin, se realizó una suspensión (30% p/v) de harina de trigo en buffer fosfato (20 mM, pH 7) y se agitó durante 1 h a 30 °C. Después, la suspensión se filtró (Whatman n° 4). El filtrado se calentó a 80 °C durante 5 min y finalmente se centrifugó (10000 g, 15 min a 4 °C) y se esterilizó por filtración (0,45 µm de tamaño de poro). A la suspensión de proteínas resultante se le inocularon las bacterias de las distintas cepas, manteniéndola a 37 °C durante 24 h. Para tal fin, se realizaron inóculos con las cepas de las bacterias lácticas de 24 h incubación cultivadas en caldo MRS modificado. Luego de este tiempo, las células se recogieron por centrifugación a 9000 g durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, se lavaron

dos veces con 20 mM de buffer fosfato estéril (pH 7,0), y se resuspendieron en el mismo buffer a una concentración de aproximadamente 10^9 CFU/mL.

Las muestras fueron mezcladas (300 μ L de muestra en 400 μ L de solución final) con buffer de muestra bajo condiciones reductoras (0,063 M Tris - HCl, pH 6,8; 1,5% p/v SDS, 3% β -mercaptoetanol, 10% v/v glicerol y 0,01% p/v azul de bromofenol). Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel (10% p/v) de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se prepararon geles de 75 mm de espesor en placas de 70 x 80 mm, de acuerdo al sistema de buffer discontinuo de Laemmli (1970). Se preparó un gel apilador y un gel separador (4 % y 12 % de acrilamida, respectivamente). Se utilizó un equipo Mini Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad laboratories, Filadelfia, EUA).

Las corridas se llevaron a cabo con voltaje constante (150 V), hasta que el frente de corrida alcanzó el final del gel (aproximadamente 90 min). Los geles fueron teñidos con 0,25% p/v azul brillante de coomassie en una solución de metanol:agua:ácido acético (4:5:1 v/v) y fueron desteñidos en el mismo solvente.

Evaluación de las propiedades reológicas de las masas

La reología es la ciencia que estudia el flujo y la deformación de la materia cuando se somete a la acción de una fuerza externa. Es una herramienta importante ya que brinda información sobre la estructura del alimento y sobre las interacciones entre los diversos componentes (Steffe, 1996). Las masas elaboradas con harina de trigo poseen un comportamiento denominado viscoelástico. En los ensayos reométricos se aplica una deformación oscilatoria de amplitud constante, las masas viscoelásticas responden a la deformación aplicada almacenando parte de la energía (componente elástica) y disipando la energía restante en forma de calor (componente viscosa).

En los ensayos de reología oscilatoria, las muestras son sujetas a una deformación que varía de manera armónica en el tiempo. Este método es el más utilizado a la hora de estudiar el comportamiento viscoelástico de un alimento, ya que los resultados son muy sensibles a la composición química y la estructura física de la muestra.

A partir de este tipo de ensayos, se obtiene un grupo de parámetros que brindan información sobre el comportamiento de la muestra:

- Módulo elástico o de almacenamiento (G'): es el parámetro vinculado a la energía que se almacena elásticamente en el sistema y puede ser recuperada cuando el esfuerzo aplicado es removido.
- Módulo viscoso o de pérdida (G''): es el parámetro relacionado con la energía perdida en forma de calor asociada al comportamiento viscoso.
- Módulo complejo (G^*): es un parámetro directamente proporcional a G' y G'' , y es una medida de la resistencia total del sistema a la deformación.
- Tangente del ángulo de desfase ($\tan \delta$): se encuentra directamente vinculada con la relación entre la energía perdida con respecto a la energía recuperada en cada ciclo. Puede variar entre 0 e infinito y cuanto menor su valor, mayor carácter elástico tiene el material estudiado.

Para la medición de las propiedades reológicas de las muestras, se elaboraron siete masas correspondientes a cada cepa y un control con su duplicado en un Glutomatic (Glutometer Pekin, China), que permitió una mezcla constante y reproducible de pequeñas cantidades de masa. Se amasó a una velocidad de 120 rpm durante 70 s, y se anuló la entrada de agua, de modo que el equipo sólo se empleó para mezclar (no se empleó el modo de lavado, normalmente empleado en este equipo para la cuantificación de gluten de las harinas). Las masas se prepararon (por duplicado) con 10 g de harina, 5,8 ml de agua y el agregado de 4 g de masa madre sal y azúcar (20% del total). Para estos ensayos se emplearon dos controles, uno de ellos consistió en realizar una masa con 10g harina 1% de sal, 2,5% de azúcar y 58% de agua, mientras que el otro se realizó con las mismas concentraciones de harina, sal, azúcar, agua y además, se acidificó hasta un pH de 3,5 con una solución de ácido láctico:acético (en una relación molar 4:1). Las muestras preparadas para reología se elaboraron sin la incorporación de levadura. Después de mezclar, las masas se retiraron suavemente del recipiente de mezcla y se colocaron en frascos plásticos que fueron introducidos en una cámara de fermentación con condiciones controladas (90% de humedad relativa, 30 °C) por 50 minutos.

Para las mediciones, se utilizó un reómetro dinámico (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania) equipado con una geometría de platos paralelos de 25 mm de diámetro. Se colocó la masa entre ambos platos que se situaron a 1 mm uno de otro, removiéndose cuidadosamente el exceso de muestra. Para evitar la evaporación del agua

durante el ensayo, los bordes expuestos se cubrieron con vaselina. Antes de comenzar con el ensayo, la muestra se dejó reposar por 5 min para permitir la relajación de las fuerzas remanentes antes de la medición. Se realizó un barrido de frecuencia de 0,1-10 Hz a una deformación del 0,3%, dentro del rango de viscoelasticidad lineal (previamente determinado mediante un barrido de deformación). Los ensayos se llevaron a cabo a 30 °C.

Panificación

Formulación de la masa

Para la elaboración de panes, se prepararon masas madres de la misma manera que para la caracterización de las cepas, es decir, con un rendimiento de masa de 100. Los panes se elaboraron con 20% de masa madre, 3% de levadura deshidratada (Saf-instant, Argentina), 1% de sal de mesa (Dos Anclas, Argentina), 2,5% de azúcar (Fronterita, Argentina) y 58 % de agua de grifo. Los controles consistieron en un pan preparado sin inóculo y otro preparado a partir de una masa acidificada a pH 3,5 con una mezcla de ácidos láctico y acético en una relación molar de 4:1, condiciones que normalmente se encuentran después de una fermentación de 24 horas de la masa (Gobbetti, 1998; Di Cagno y col., 2002).

Ensayo de panificación

Se pesaron los ingredientes en una balanza analítica. La levadura se homogeneizó suspendiéndola en agua antes de incorporarla al resto de los ingredientes sólidos. La temperatura del agua se calculó para obtener una masa con una temperatura final de 27 ± 1 °C. Los ingredientes fueron mezclados en una amasadora Argental L-20 (Argental, Argentina) durante 3 min a baja velocidad para formar el bollo de masa y luego se amasó durante 4 min a alta velocidad. La masa resultante fue llevada a la cámara de fermentación (primera fermentación) por 80 min a 30 °C y 80% de humedad relativa con dos *punchs* (proceso parcial de desgasificación) intermedios (el primero a los 45 min, y el segundo a los 60 min). Luego, la masa fue laminada para remover el gas en una laminadora Mi-Pan vf roller (Mi-Pan, Argentina) y dividida en fragmentos de 150 g. Los trozos de masa fueron moldeados por una armadora (Braesa, Brasil), colocados en moldes y llevados a la cámara de fermentación durante 75 min a 30 °C y 80% de humedad relativa (segunda

fermentación). Después de este tiempo, las piezas fueron horneadas a 215 °C por 15 min en un horno rotativo a gas Pauna (Buenos Aires, Argentina). Cada ensayo de panificación fue realizado por duplicado.

Evaluación de la calidad tecnológica de los panes

Volumen específico: el volumen específico de los panes se determinó 24 h (día 1) luego de horneados; para ello, las piezas de pan se pesaron y se determinó su volumen por desplazamiento de semillas de colza. El volumen específico se calculó como la relación volumen/peso. Se realizaron 3 determinaciones de cada lote de panificación, y se informó el valor promedio \pm desvío estándar de los dos ensayos de panificación.

Análisis de perfil de textura (TPA): el perfil de textura se evaluó utilizando un texturómetro (Instron, EUA) equipado con una celda de 50 N y una sonda cilíndrica de 2,5 cm de diámetro. Se cortaron dos rodajas de 2,5 cm de espesor del centro de la pieza de pan, y cada una se sometió a un doble ciclo de compresión. La firmeza y gomosidad de la miga se calcularon a partir de un gráfico de fuerza vs. tiempo (Bluehill 2, Instron, EUA). La *firmeza*, expresada en Newton (N), se definió como la fuerza máxima que tiene lugar durante el primer ciclo de compresión (Bourne, 1978) y a la *gomosidad*, expresada en Newton (N), que se relaciona con la fuerza requerida para desintegrar un alimento semisólido hasta estar en condiciones de ser deglutido.

Para evaluar el perfil de endurecimiento de la miga, el TPA se llevó a cabo 24 h luego del horneado y a los 7 días de almacenamiento. La velocidad de endurecimiento se calculó como la pendiente de la recta de regresión obtenida a partir de los puntos de medición. Los panes fueron almacenados en bolsas plásticas selladas, en una sala con temperatura controlada (25 °C).

Color de la corteza: el color de la corteza se evaluó empleando un espectrofotómetro (CM-508d Minolta, EUA). Las mediciones se realizaron según el método 14-22 (AACC Internacional, 2000) utilizando 8 mm de apertura de la medición y un iluminador D65. El espectrofotómetro fue calibrado antes de cada ensayo con un plato estándar blanco. De cada ensayo de panificación se tomaron 3 panes, a los que se les efectuaron 5 mediciones de color en la corteza informándose el valor promedio, Como medida objetiva del color se utilizó el sistema Cie-Lab (C.I.E., 1986), que define cada color a partir de tres coordenadas

denominadas L^* , a^* y b^* , Las magnitudes L^* , a^* y b^* son adimensionales y se definen en función del tipo de estímulo y del blanco de referencia para tratar de simular a los observadores reales (Joshi y Brimelow, 2002). La coordenada L^* recibe el nombre de luminosidad y a^* y b^* son las coordenadas colorimétricas que forman un plano perpendicular a la luminosidad, siendo, a su vez, perpendiculares entre sí (Figura 4). El corte del eje L^* con el plano que forman a^* y b^* es el punto acromático. El valor a^* es una medida de la intensidad de color rojo, hacia valores positivos se observan los colores rojos y para valores negativos, los verdes, El valor b^* es una medida de la intensidad de color amarillo, hacia valores positivos se observan los amarillos, y para valores negativos, los azules.

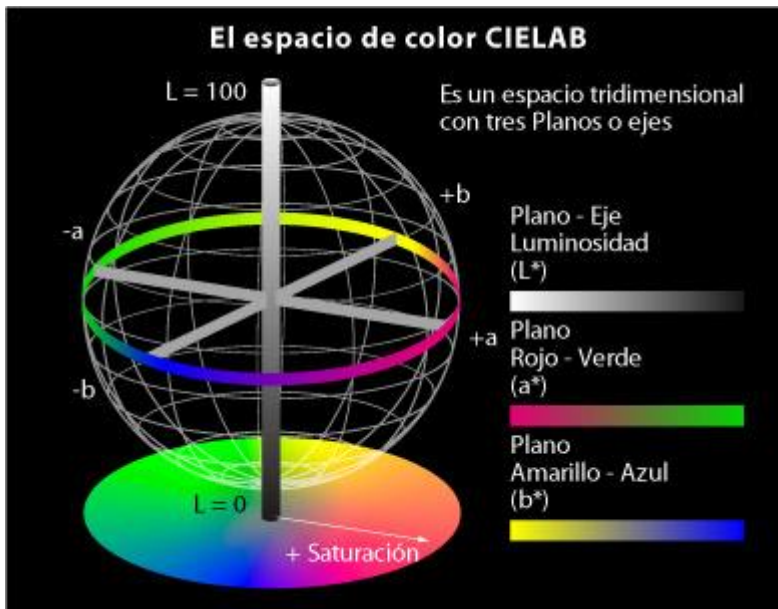


Figura 4. Sistema Cie-Lab

Estructura de la miga

La estructura de la miga se puede evaluar a través de medidas de tamaño de alveolo, mediante análisis de imágenes de la miga de pan. La imagen entera es fragmentada por un valor de gris (valor umbral) para crear una imagen binaria, todos los pixeles con nivel de gris por encima del umbral se muestran en blanco y por debajo en negro (Figura 5). Se puede generar una imagen binaria óptima por la selección de un simple umbral de gris. Los pixeles con valores de gris más bajos que el valor umbral, se consideran objeto (miga de pan) y los valores de gris por encima del valor umbral se consideran aire (alveolo). Se puede encontrar interactivamente un nivel apropiado de umbral de gris, variando el nivel de gris hasta que la imagen conserve los rasgos fundamentales de la contraparte monocromática (Sapirstein y col., 1994, Tan y col., 1997).

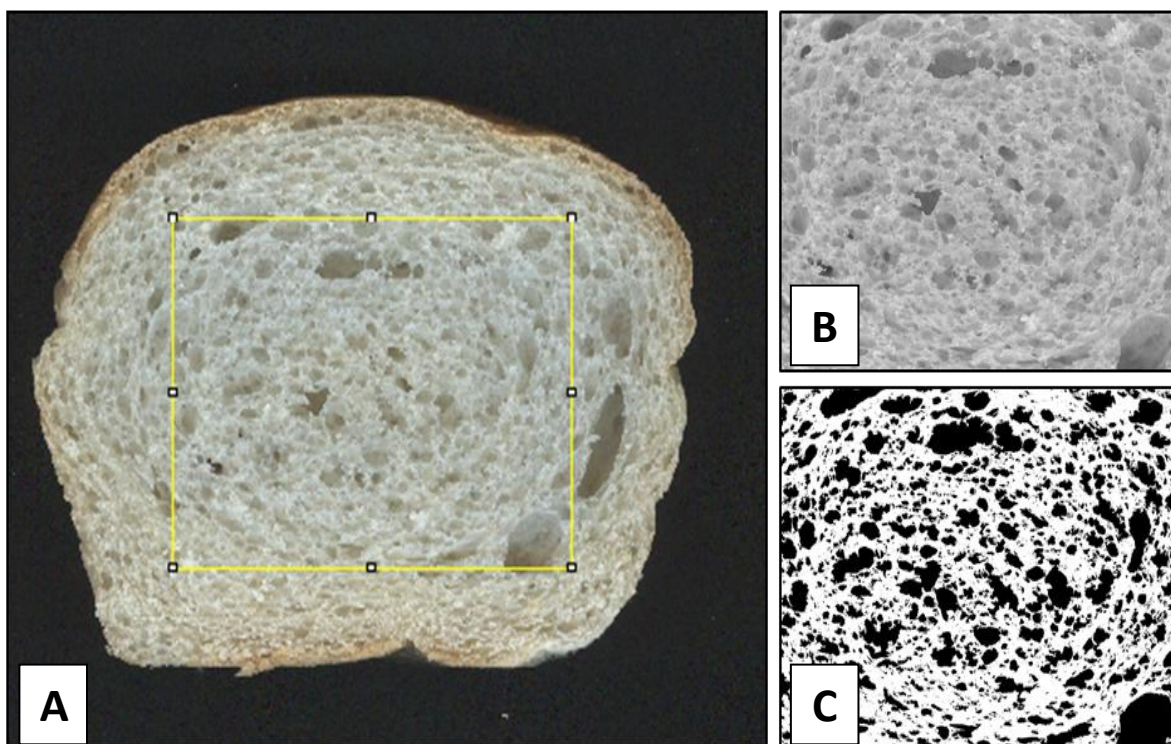


Figura 5. Estructura de la miga. Fotografía de una rodaja de pan, mostrando el área seleccionada (A), el área seleccionada en una escala de gris (B), y transformada en imagen binarizada (C). Todos los pixeles con un nivel de gris por encima del valor umbral son convertidos en blanco (miga de pan), y por debajo del umbral en negro (alveolos).

Para analizar la estructura de la miga se obtuvieron dos rodajas (2,5 cm de espesor) de la región central de cada pan y cada rodaja fue escaneada con un escáner fotográfico (HP Scanjet G3010, Palo Alto CA, EUA). La imagen en formato de archivo TIFF se analizó con el programa de análisis de imágenes Image-J 1,46r (National Institutes of Health, EUA). Se seleccionó manualmente de la parte central de la rodaja un área de igual tamaño en todos los panes, que fue representativa de la miga total de cada rodaja. La imagen de color se convirtió a imagen de 8-bits y se analizó en escala de grises (0 negro, 255 blanco). La segmentación de la imagen (conversión a imagen binaria, blanco y negro) la hizo el programa por selección automática del valor del umbral. Este método de selección del valor umbral representó mejor los rasgos fundamentales de las imágenes. Del análisis de las imágenes se obtuvieron los siguientes parámetros:

- **Área media de alveolo, TA:** área promedio de los alveolos. Área de un alveolo = número de pixeles que hacen al alveolo multiplicado por el área de un pixel.
- **Número total de alveolos por cm²:** cantidad de alvéolos por unidad de superficie de miga de pan.
- **Fracción de Área, FA:** es el porcentaje del área total que corresponde al área ocupada por alveolos. Relación entre el área total ocupada por alveolos y el área total seleccionada.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el programa estadístico INFOSTAT (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina). Todos los ensayos se realizaron por duplicado y se informó el promedio \pm desvío estándar. Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANAVA). En el caso de presentar diferencias, la comparación de las medias se analizó mediante el test de Fisher (LSD) con un nivel de significancia de 0,05. La relación entre los distintos parámetros se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson con $p \leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis microbiológicos, determinación de pH y acidez total titulable (ATT).

En la Tabla 3 se presentan los resultados de recuento de placa, pH y ATT para las cepas estudiadas. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el recuento de masas madre con un período de incubación de 24 horas, se pudo determinar una diferencia marcada en el crecimiento de las cepas con fermentación heterolácticas en relación a las homolácticas. Las primeras tuvieron un crecimiento mayor, además de valores de pH mucho más bajos y mayor ATT, observándose una correlación negativa entre esta y el pH ($r = -0,981$, $p < 0,05$).

Tabla 3. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), pH y acidez titulable (ATT) en las masas utilizadas.

Cepas	Recuento (UFC/mL)	pH	ATT (mL de NaOH)
<i>Lactobacillus pentosus</i> 124	$3,8 \times 10^9$	3,41	13,75
<i>Lactobacillus plantarum</i> 137	$1,74 \times 10^9$	3,46	14,25
<i>Lactobacillus fermentum</i> 142	$1,38 \times 10^9$	3,5	12,5
<i>Lactobacillus fermentum</i> 148	$1,85 \times 10^9$	3,48	13,75
<i>Lactobacillus plantarum</i> 147	$1,86 \times 10^9$	3,41	13,5
<i>Lactobacillus paralimentarius</i> 259	$1,64 \times 10^9$	3,38	14,25
<i>Lactobacillus brevis</i> 253	$1,60 \times 10^9$	3,53	13,25
<i>Pediococcus acidilactici</i> 22	$2,86 \times 10^7$	4,15	6
<i>Enterococcus faecium</i> 74	$3,92 \times 10^7$	4,16	6,5
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	$2,99 \times 10^9$	3,47	14

Perfil de azúcares

En cuanto al análisis del perfil de azúcares mediante HPLC, en la muestra control sin fermentar se observan tres picos. Teniendo en cuenta los azúcares encontrados en las harinas y masas fermentadas, y de acuerdo a los tiempos de retención los picos observados, los picos corresponderían a dextrinas, isomaltosa, maltosa y sacarosa (estos dos últimos coeluyen en el sistema utilizado).

Se observaron diferencias en el contenido de azúcares entre las masas madre de cepas homofermentativas y heterofermentativas.

En el perfil cromatográfico correspondientes a las cepas homofermentativas, *Pediococcus acidilactici* 22 y *Enterococcus faecium* 74, además de los picos encontrados en las masas sin fermentar y a las 24 h, se observan dos picos más que corresponderían con los monosacáridos glucosa y fructosa de acuerdo a los tiempos de retención, eluyendo a los 12,5 y 16 min, aproximadamente (Figura 6).

En los perfiles de las cepas heterofermentativas se encontraron picos correspondientes a maltosa/sacarosa, isomaltosa y dextrinas (Figura 7).

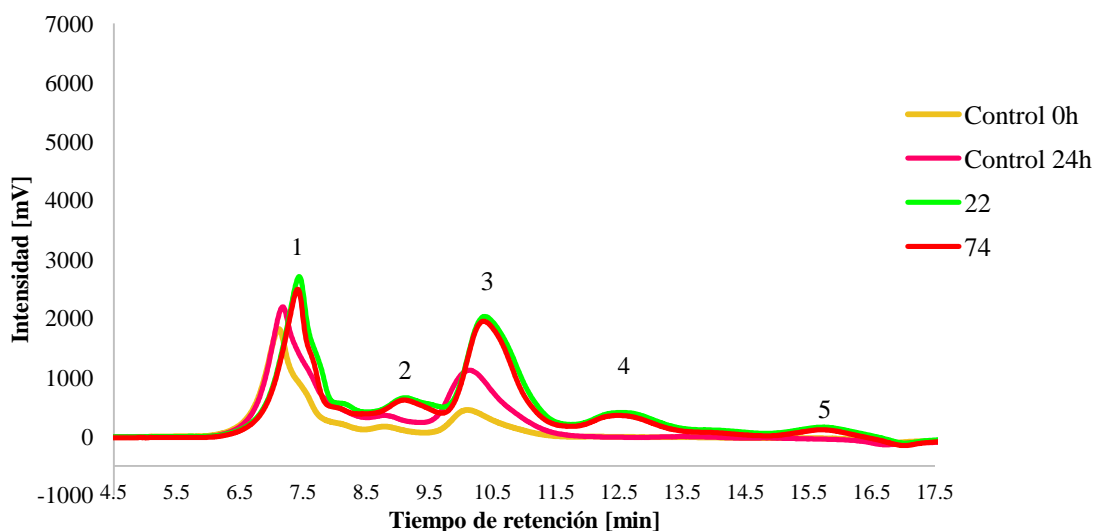


Figura 6. Cromatogramas obtenidos por HPLC de los extractos de masas madre. Control 0h: control sin inóculo y sin incubación; Control 24h: control sin inóculo con 24 h de incubación a 30 °C; 22 y 74: masas madre inoculadas con cepas homofermentativas,

Pediococcus acidilactici 22 y *Enterococcus faecium* 74. Los picos corresponden a dextrinas (1), isomaltosa (2), maltosa/sacarosa (3), glucosa (4) y fructosa (5).

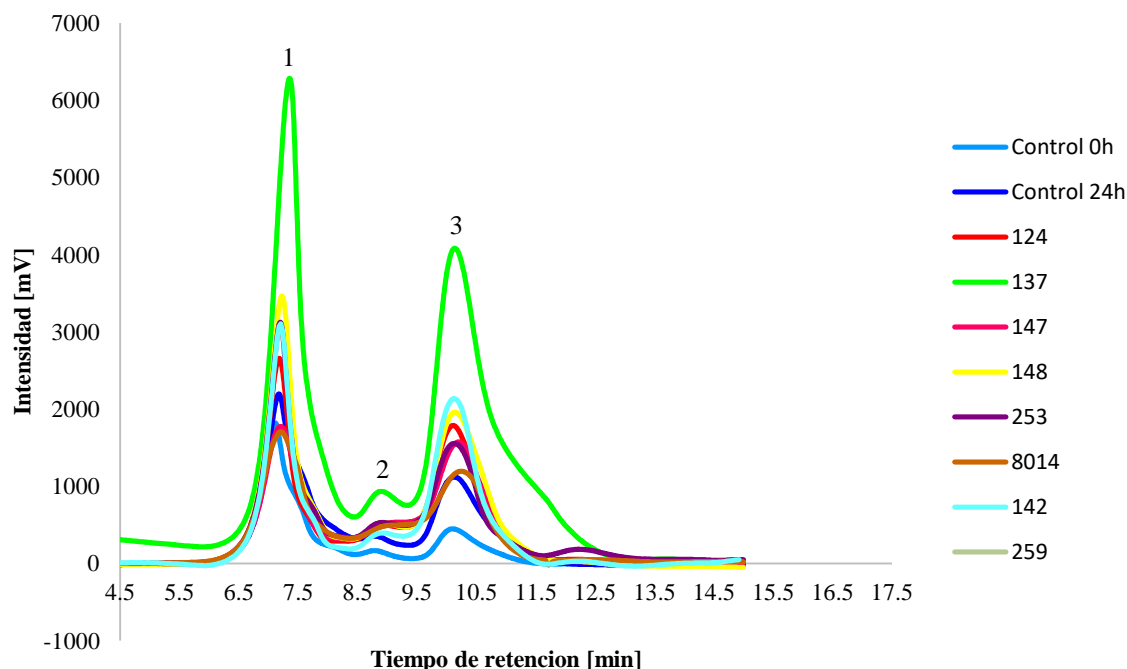


Figura 7. Cromatogramas obtenidos por HPLC a partir de extractos de masas madre de harina de trigo. Control 0h: control sin inóculo y sin incubación; Control 24h: control sin inóculo con 24h de incubación a 30 °C; 124, 137, 147, 148, 253, 259, 8014 y 142: masas madres inoculadas con cepas heterofermentativas, *Lactobacillus pentosus* 124, *Lactobacillus plantarum* (137, 147 y ATCC 8014), *Lactobacillus fermentum* (148 y 142), *Lactobacillus brevis* 253 y *Lactobacillus paralimentarius* 259. Los picos corresponden a dextrinas (1), isomaltosa (2), maltosa/sacarosa (3).

La presencia de monosacáridos como fructosa y glucosa en masas fermentadas con cepas lácticas homofermentativas puede explicarse teniendo en cuenta el metabolismo de los azúcares propio de estas bacterias, combinado con la acción de enzimas intrínsecas de la harina. Las enzimas α - y β -amilasa son inhibidas a un pH menor a 4,5. Por lo tanto, en aquellas masas fermentadas con cepas de pediococos, el pH alcanzado permite la continua actividad de estas enzimas. De manera que maltosa e isomaltosa continúan generándose a partir de almidón y las enzimas glucoamilasas degradan los disacáridos a fructosa y

glucosa. El recuento de bacterias lácticas en las masas homofermentativas también es menor respecto a las heterofermentativas contribuyendo a un menor consumo de estos monosacáridos.

En el caso de las masas fermentadas con cepas heterofermentativas, el recuento de las mismas al cabo de 24 h es mayor a las de las homofermentativas (Tabla 3). La capacidad acidificante de estas cepas lleva a las masas a un pH que resulta inhibitorio para las amilasas, por lo que alcanzado cierto punto de la fermentación, no hay aumento de maltosa disponible para las glucoamilasas que permanecen activas (Gänzle, 2014). Los monosacáridos del medio son utilizados por las bacterias lácticas de manera que a las 24 horas no se detecta presencia de los mismos. Este mecanismo general varía de acuerdo a la cepa, por lo que en algunos casos (cepas *L. plantarum* 137 y 147) el perfil de azúcares observado demuestra la presencia de un hombro en el pico que eluye a los 10 min. Esto indica que hay una coelución de azúcares y podría tratarse de glucosa de acuerdo a los tiempos de retención. Esto indicaría una capacidad de estas cepas de utilizar concomitantemente glucosa y maltosa, por lo que es detectada presencia del monosacárido, o una menor velocidad de utilización de estos azúcares por parte de estas cepas. Las cepas que presentan maltosa fosforilasa, que cataliza la conversión de maltosa a glucosa 1-fosfato y glucosa, presentan ventaja en matrices como la masa madre que tiene como azúcar principal la maltosa. Esta capacidad se ha observado en cepas de *L. plantarum* (Vrancken y col., 2011)

A pesar de que la altura de los picos de dextrinas y maltosa son distintos en cada cepa, la relación entre ambos picos se mantiene (datos no mostrados). Esto coincide con reportes de masas madre realizadas utilizando *L. fermentum* y *L. plantarum* (Van der Meulen y col., 2007; Ravyts y De Vuyst, 2011). Como se mencionó anteriormente, la presencia de maltosa durante la fermentación se debe a la combinación entre el consumo del disacárido y la generación del mismo por parte de las enzimas intrínsecas de la harina (Robert y col., 2006). La acidificación (hasta un límite inferior de 3,5) favorece la mayor actividad de enzimas de cereal lo que genera mayor disponibilidad de maltosa, esto explicaría la mayor concentración relativa de maltosa, de acuerdo al área del pico correspondiente, en todas las fermentaciones respecto a las masas sin inóculo.

Determinación de compuestos volátiles

Como se esperaba, las cepas heterofermentativas produjeron mayor número de compuestos volátiles, detectándose 14 compuestos principales (Tabla 4).

Tabla 4. Perfil de compuestos volátiles detectados mediante cromatografía gaseosa para las distintas masas madre. Control 24h (sin inóculo); cepas heterofermentativas (259, 147, 8014, 253, 148, 142, 124 y 137); cepas homofermentativas (74 y 22). Compuestos no detectados (0) y en incremento (+) durante la fase de crecimiento de las bacterias lácticas.

Compuesto	Control 24h	Cepas de bacterias lácticas									
		Heterofermentativas								Homofermentativas	
		259	147	8014	253	148	142	124	137	74	22
Acido acético	0	+++	++	++++	++	++++	+	++++	++	0	0
1-pentanol	0	++	+++	++++	++	0	++++	+	+++	0	0
Hexanal	0	+++	+++	++++	0	++++	++++	++++	+++	++++	++++
1-hexanol	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++
Heptanal	0	0	0	0	0	0	++	0	0	0	0
1-heptin-1-ol	0	+	0	0	0	0	+++	++	+	+++	++
1-heptanol	0	++	0	++++	+	0	++++	++	+	0	0
1-octen-3-ol	0	+	++	++++	++	+++	0	++++	++	0	0
2-pentilfuran	0	++	++	++++	++	+++	0	+++	++	0	0
Octanal	0	0	0	0	0	0	++++	0	0	0	0
2-octenal	0	++	+	0	0	+++	0	++	++	+++	++
2-octen-1-ol	0	++	0	++++	+	++++	+++	+	0	0	0
Neptaleno	0	+	0	+++	+	+++	0	+	+	+	+
1-octanol	0	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Una combinación de crecimiento rápido y una fuerte disminución del pH es importante para garantizar la competitividad de una cepa de bacteria láctica en una masa madre (De Vuyst y col., 2014). Las cepas *L. plantarum* (ATCC 8014 y 137), *L. fermentum*

(148 y 142) y *L. pentosus* ES 124 presentaron, además de alta acidez titulable, mayor producción de ácidos orgánicos y compuestos volátiles que contribuyen al aroma como hexanal, 2-octenal y 1-pentanol (Figuras 8-10). Las cepas homofermentativas presentaron un perfil similar destacándose la producción de hexanal, octenal y hexanol. La cepa *L. paralimentarius* 259, presentó mayor número de compuestos. *P. acidilactici* 22 y *E. faecium* 74, y la cepa heterofermentativa *L. fermentum* 148 presentaron una producción elevada de hexanal (Figura 8). Este compuesto es comúnmente encontrado en este tipo de fermentaciones, y aunque en algunos casos no es deseable su presencia en altas concentraciones, la combinación con cepas heterofermentativas que metabolizan hexanal puede neutralizar su efecto en caso que resulte negativo para el flavor.

Hexanal

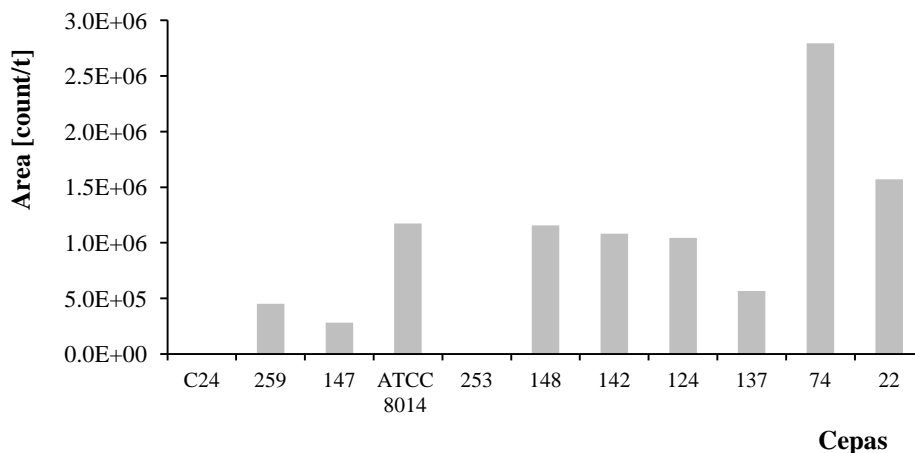


Figura 8. Producción de hexanal por las cepas evaluadas.

2-octenal

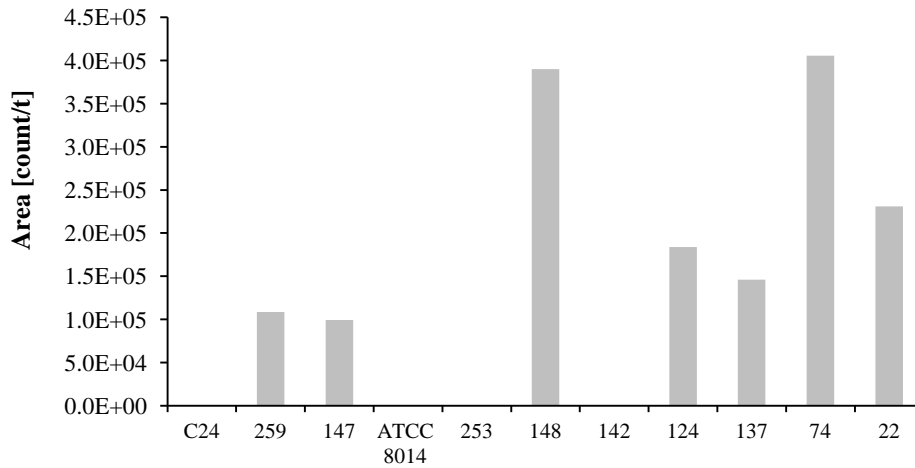


Figura 9. Producción de 2-octenal por cada muestra de masa madre evaluada.

1-pentanol

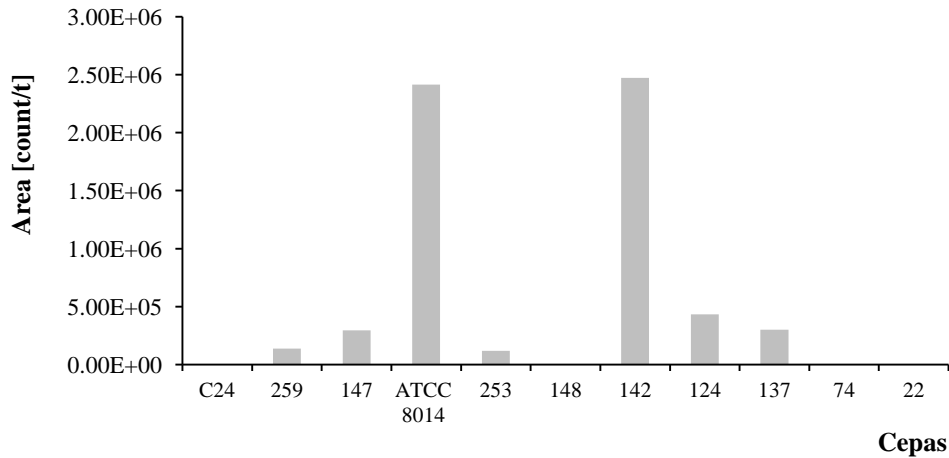


Figura 10. Producción de 1-pentanol por masas madre de las cepas en estudio.

La presencia de ácido acético, hexanal y nonanal en elevada cantidad relativa se ha observado en varias fermentaciones con bacterias lácticas como *L. fermentum*, *L. plantarum* y *L. brevis*, entre otras (Ravyts y De Vuyst, 2011). Otros compuestos producidos, como el octanol, pentanol y heptanal, contribuyen al flavor general (Ravyts y De Vuyst, 2011; Pétel y col., 2017).

También se destaca la mayor producción de ácido acético en *L. pentosus* 124 y *L. fermentum* 148. La relación entre el ácido láctico y el ácido acético, definida como el *cociente de fermentación* (FQ), es un factor importante que puede afectar el perfil del aroma, aunque también es relevante para la estructura de los productos de panificación finales. El ácido acético, producido por las LAB heterofermentativas, es responsable de un gluten más tenaz, mientras que el ácido láctico puede explicar gradualmente una estructura de gluten más elástica (Lorenz, 1983). Es decir, los productos del metabolismo de la cepa predominante en la masa madre afectan directamente el comportamiento reológico de la masa panaria. La menor producción de ácido acético (Figura 11) por parte de algunas cepas como *L. plantarum* 137 y *L. plantarum* 147 está de acuerdo con lo observado en el análisis de HPLC que demostró la probable presencia de monosacáridos a las 24 h.

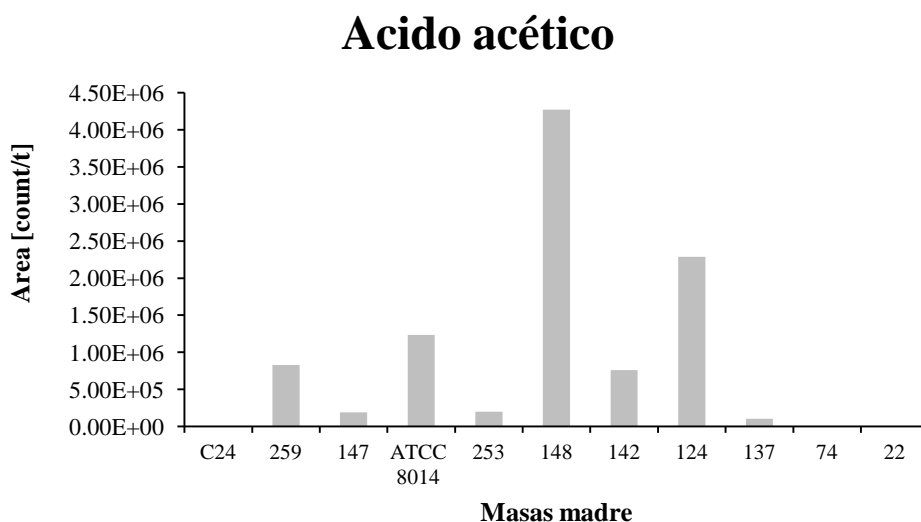


Figura11. Producción de ácido acético por las distintas masas madre en estudio. C24: control 24h sin inóculo.

Por otro lado, no se detectó la presencia de etilacetato, diacetilo y otros aldehidos en las muestras, esto probablemente se deba a las características de la columna y/o el protocolo utilizado que limitó la identificación de compuestos de bajo peso molecular, por lo que será necesario en futuras investigaciones realizar los ajustes necesarios en el protocolo a fin de ampliar el espectro de compuestos identificados. Por otra parte, es posible que ciertos compuestos volátiles se produzcan antes de las 24 h de fermentación y

no sean detectables al tiempo de fermentación analizado en este trabajo. Es conocido que *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. paraalimentarius* son especies halladas frecuentemente en masas madre y constituyen los microorganismos dominantes, por lo que las cepas de estas especies que reúnen características tales como una rápida acidificación, producción de volátiles y efecto proteolítico, son candidatas a ser utilizadas como starters en masas (Corsetti, 2007; Siragusa, 2009).

Evaluación de la capacidad proteolítica

En la Figura 12 se muestran los electroforegramas obtenidos para las proteínas extraídas en buffer fosfato a partir de las distintas muestras de masas madre. A partir de la masa control se pueden observar bandas que abarcan masas moleculares en el rango de 45000-14000, de acuerdo con trabajos previos (Steffolani y col., 2010). Se observan diferencias en las intensidades de bandas entre la masa control con y sin incubación (C24 y C0, respectivamente), probablemente como resultado de la actividad metabólica de LAB endógenas. En cuanto a las masas fermentadas, éstas presentaron diferentes perfiles respecto al número de bandas e intensidad de las mismas, indicando que las cepas tuvieron diferentes capacidades de degradar las proteínas que se encontraron en el extracto. Las masas con las cepas *L. pentosus* 124, *L. plantarum* (147 y ATCC8014) y *L. fermentum* (148 y 142) presentaron menor cantidad de bandas, observándose una disminución principalmente de las bandas de mayor masa molecular (Fig. 12). La cepa *L. plantarum* 137 presenta aún menor número e intensidad de bandas respecto a las anteriores.

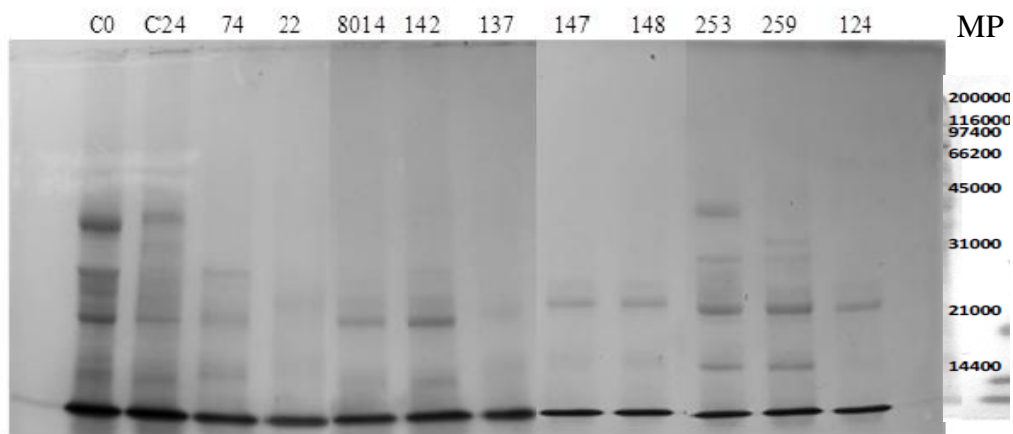


Figura 12. Efecto de las cepas sobre las proteínas solubles en condiciones reductoras. C0 y C24: controles sin inóculo a las 0h y 24h respectivamente; 74 y 22: cepas homofermentativas; 8014, 142, 137, 147, 148, 253, 259 y 124: cepas heterofermentativas.

Aplicación de las cepas estudiadas en productos de panificación

Para continuar con la segunda parte de este trabajo, que consistió en el estudio del efecto de las cepas estudiadas sobre una matriz alimentaria, se seleccionaron, en base a los resultados hasta aquí expuestos, 5 cepas. Se tomaron en cuenta su capacidad acidificante, producción de compuestos volátiles, perfil de azúcares y análisis de proteínas solubles. De esta manera, las cepas *L. pentosus* 124 y *L. fermentum* 148 se seleccionaron por su capacidad de producción de ácido acético, *L. plantarum* 137 se utilizó por su capacidad proteolítica y su menor producción de ácido acético, que permitió compararla con las cepas anteriores: en tanto que *L. fermentum* 142 se seleccionó por su poder acidificante y por presentar un perfil más diverso de compuestos volátiles. La cepa *L. plantarum* ATCC8014 es útil dado que es una cepa de colección que permite utilizarla como referencia. A estas capacidades se suman la producción de folato (vitamina hidrosoluble del complejo de vitaminas B, necesaria para la formación de proteínas estructurales y hemoglobina) por *L. pentosus* 124 y *L. plantarum* 137 por lo que es interesante ver su comportamiento en panificación.

Evaluación de las propiedades reológicas de las masas

La utilización de masa madre tiene efectos marcados en la reología de la masa de panificación, la que se obtiene, en general, con la incorporación de un 5 a un 40% de masa madre (Kawamura y Yonezawa, 1982, Wehrle y Arendt, 1998, Clarke y col., 2004).

Los efectos de la masa madre o del ácido láctico-acético sobre las propiedades viscoelásticas de la masa se examinaron empleando barridos de frecuencia a una deformación constante. A partir del análisis de los valores de los módulos G' , G'' y G^* mostrados en la Tabla 5, se observa que la masa control presentó mayor resistencia a la deformación, expresada como un mayor valor de estos módulos. Los valores de $\tan \delta$ de las masas correspondientes a las cepas *L. plantarum* 137 y *L. fermentum* (142 y 148) fueron

mayores al control, en tanto que el resto de las muestras no presentaron diferencias significativas. Un incremento de $\tan \delta$ está relacionado con la formación de estructuras que tienden a ser más fluidas, o sea, la actividad de las cepas lácticas aumentó la fluidez de las masas, es decir, derivó en masas con interacciones estructurales más débiles, o en masas con estructuras con menos puntos de interacción molecular. No obstante, la masa acidificada presentó menor valor de $\tan \delta$, comparada con las muestras inoculadas. En este sentido, la masa inoculada con la cepa *L. pentosus* 124 se aproxima al comportamiento reológico de la masa control, es decir, no provocó una alteración estructural tan marcada como las demás.

Tabla 5. Valores de los distintos módulos: elástico (G'), viscoso (G''), complejo (G^*) y $\tan \delta$ correspondientes a una frecuencia de 1 Hz.

Muestras	G' (KPa)	G'' (KPa)	G^* (KPa)	$\tan \delta$
C	27,1±0,4 c	8,2±0,3 d	29,5±2,2 c	0,303±0,006 ab
M.A	18,1±1,1 a	5,2±0,3 a	21,6±5,6a	0,286±0,000 a
124	21,9±1,5 b	6,8±0,3 c	22,9±1,5 b	0,311±0,006 bc
137	16,8±2,3 a	5,5±0,7 ab	17,7±2,4 a	0,329±0,006 c
142	17,2±2,7 a	5,4±0,9 ab	20,9±5,3 a	0,315±0,003 bc
148	19,2±0,5 ab	6,4±0,5 bc	20,2±0,6 ab	0,333±0,019 c
8014	15,6±1,8 a	4,9±0,7 a	16,3±1,9 a	0,313±0,006 bc

Los valores se informan como promedio±desvío estandar. Valores seguidos por la misma letra dentro de una columna indican que no hay diferencias significativas ($p \geq 0,05$), G' : módulo elástico; G'' : módulo viscoso; G^* : módulo complejo; $\tan \delta$: tangente de pérdida. C: masa sin inóculo; M.A: masa acidificada; 124, 137, 142, 148, 8014: masas madre con el inóculo correspondiente a cada cepa.

Los valores de $\tan \delta$ en función de la frecuencia se presentan en la Figura 13. Todas las masas mostraron la misma tendencia, es decir, cuando la frecuencia aumentó de 0,1 a 10 Hz, los valores de la tangente de pérdida disminuyeron primero hacia un valor mínimo antes de aumentar de nuevo a frecuencias mayores. La inoculación con masa madre tiende a incrementar la $\tan \delta$ respecto al control, según los perfiles que se muestran en la figura.

La tangente δ también es función de la frecuencia y está directamente vinculada con la relación entre la energía perdida con respecto a la energía almacenada en cada ciclo. Puede variar entre 0 a infinito y cuanto menor su valor, mayor carácter elástico tiene el material estudiado. Por lo tanto, la adición de masa madre redujo la elasticidad de la masa en contraste con la acidificación química, que la aumentó. Esto concuerda con lo reportado en bibliografía por Hosoney (1994) y también fue observado por Clarke y col. (2002), en este caso trabajando con masas madre con una sola cepa, una de *L. brevis* L-62 (SS1) y otra de *L. plantarum* L2-1 (SS2), y una mezcla de las mismas BRSW (MS). Todas comparadas con un control sin inóculo y una masa químicamente acidificada.

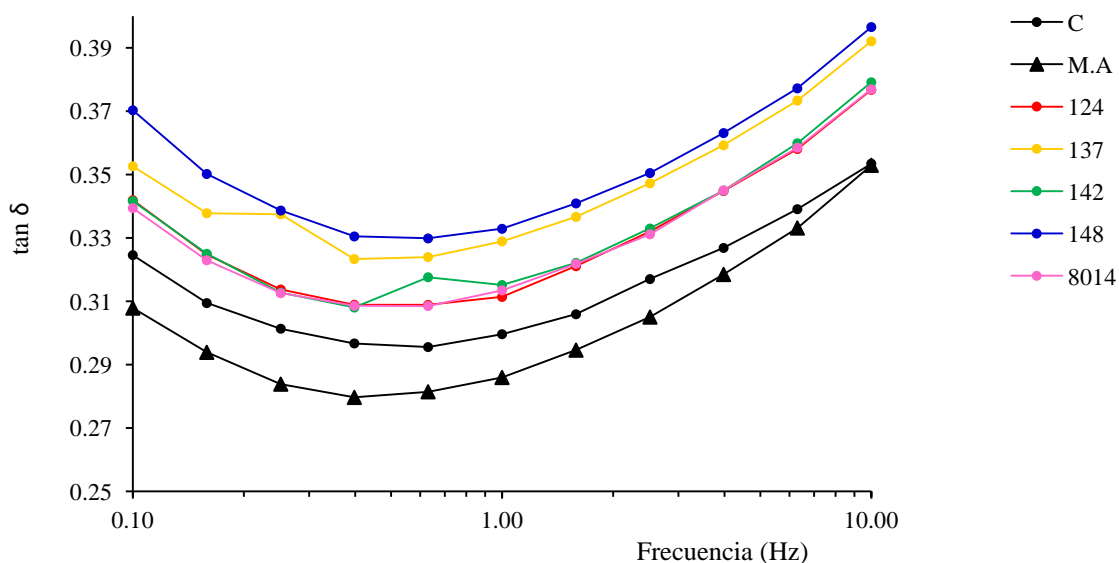


Figura 13. Tangente del ángulo de desfase en función de la frecuencia para las formulaciones de masas de trigo: control (no acidificada), masa acidificada (masa químicamente acidificada con una solución de ácido láctico-acético), 124, 137, 142, 148 y 8014 (masas biológicamente acidificadas con el agregado del inóculo correspondiente a cada cepa de bacteria láctica).

La energía almacenada durante la deformación está representada por el módulo elástico o de almacenamiento, G' , y la energía disipada en el elemento viscoso por el módulo viscoso o de pérdida, G'' . También se analiza la relación entre la amplitud del esfuerzo y la deformación máxima, denominada módulo complejo, G^* . Este es una medida de la resistencia total del material a la deformación aplicada.

Si la muestra es puramente elástica, $\delta = 0^\circ$, $G^* = G'$ y $G'' = 0$, Por el contrario, si es puramente viscosa, $\delta = 90^\circ$, $G^* = G''$ y $G' = 0$.

Los valores del módulo complejo en función de la frecuencia, se expresan en la Figura 14, donde se observa que las muestras inoculadas y la muestra acidificada presentaron menores valores de G^* respecto al control sin acidificar, lo que se traduce en estructuras menos resistentes ($p < 0,05$). Los tratamientos realizados en las muestras ocasionaron un deterioro en la estructura de la masa, ya que una menor resistencia está asociada a estructuras con interacciones más débiles o con estructuras con menor número de puntos de interacción. Las muestras que presentaron estructuras menos resistentes a la deformación respecto al control fueron *L. plantarum* (137 y ATCC8014) y *L. fermentum* 148. Igualmente es interesante destacar que la masa con *L. pentosus* 124 mostró un comportamiento similar al de la masa control.

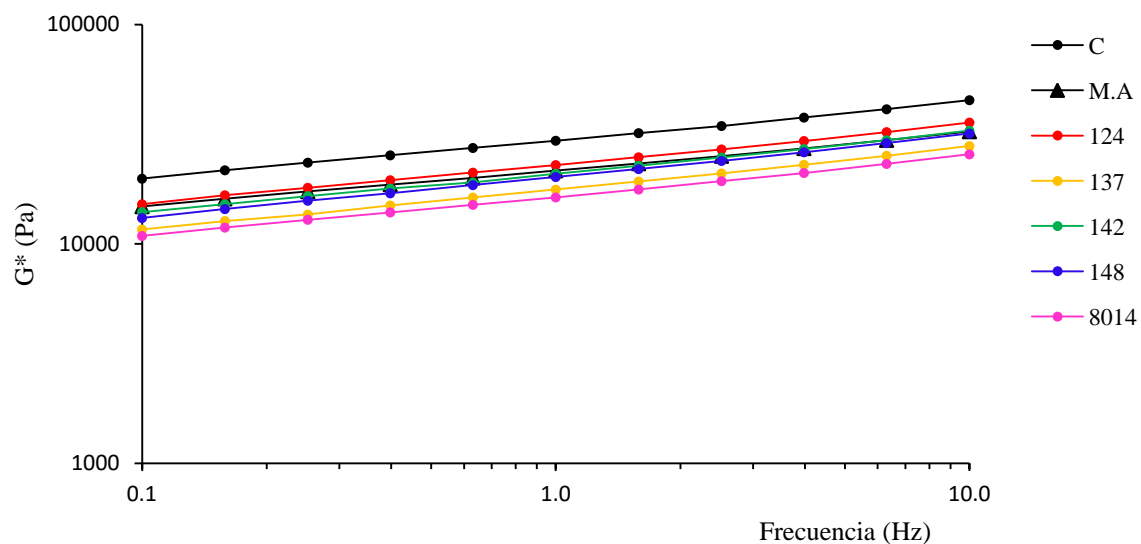


Figura 14. Módulo complejo en función de la frecuencia para las formulaciones de masas de trigo: Control (no acidificada), masa acidificada (masa químicamente acidificada con una solución de ácido láctico-acético), 124, 137, 142, 148 y 8014 (masas biológicamente acidificadas con el agregado del inóculo correspondiente a cada cepa de bacteria láctica).

La fermentación provoca menor elasticidad y viscosidad en la masa madre (Kawamura y Yonezawa, 1982; Wehrle y Arendt, 1998; Clarke y col., 2004), y este efecto es más marcado con tiempos de fermentación más largos (Clarke y col., 2004). Además, se ha reportado una menor resistencia a la extensión y una mayor extensibilidad para las

masas que contienen masa madre (Di Cagno y col., 2003). Esto concuerda con los experimentos realizados en este trabajo, ya que se utilizó un 20% de masa madre para la preparación de la masa de panificación, y la fermentación disminuyó la elasticidad y viscosidad comparada con la masa control.

La actividad enzimática y la formación de ácidos son una importante causa que explica los cambios reológicos observados en la masa madre y en la masa final de panificación. Se ha demostrado que la acidificación química aumenta la solubilización de las proteínas debido a una carga neta positiva en condiciones ácidas (Maher Galal y col., 1978). Bajo condiciones óptimas de mezclado, la masa acidificada muestra un comportamiento más elástico (Wehrle y col., 1997) e incrementa la suavidad y extensibilidad del gluten (Schober y col., 2003). Este efecto se puede observar en la Figura 13, donde la $\tan \delta$ de la masa acidificada muestra el menor valor para una frecuencia de 1Hz. Sin embargo, este efecto no se observó en las masas fermentadas; en este procedimiento, el desarrollo de la acidez es progresivo con el tiempo (no instantáneo como en las masas químicamente acidificadas) permitiendo que las enzimas endógenas de los cereales (y la microbiota) afecten la textura de la masa. En este sentido, existe una fuerte indicación de que el nivel de cambios reológicos que tienen lugar en estas masas (y su subsiguiente influencia en la calidad del pan) puede controlarse ajustando el tiempo de fermentación (Clarke y col., 2004).

Evaluación de la calidad tecnológica de los panes

En la Tabla 6 se presentan los resultados del volumen específico (VE) y de los parámetros que definen la estructura de la miga de las muestras analizadas. El mayor volumen específico se observó para el pan elaborado con la masa control, y el menor fue obtenido con la masa químicamente acidificada. Los panes con las cepas *L. fermentum* 148 y *L. plantarum* 142 presentaron un volumen específico similar al de la masa acidificada. Por otro lado, los panes con las cepas *L. pentosus* 124 y *L. plantarum* 137 mostraron un volumen significativamente mayor al de la masa químicamente acidificada.

El estudio de la apariencia estructural de los productos mediante el análisis digital de imagen ha demostrado ser una metodología efectiva, confiable, y ampliamente utilizada en la industria de los cereales con el objetivo de evaluar la calidad de los productos, como la miga de pan (Bertrand y col., 1992; Sapirstein y col., 1994; Sapirstein, 1999) (Figura 15).

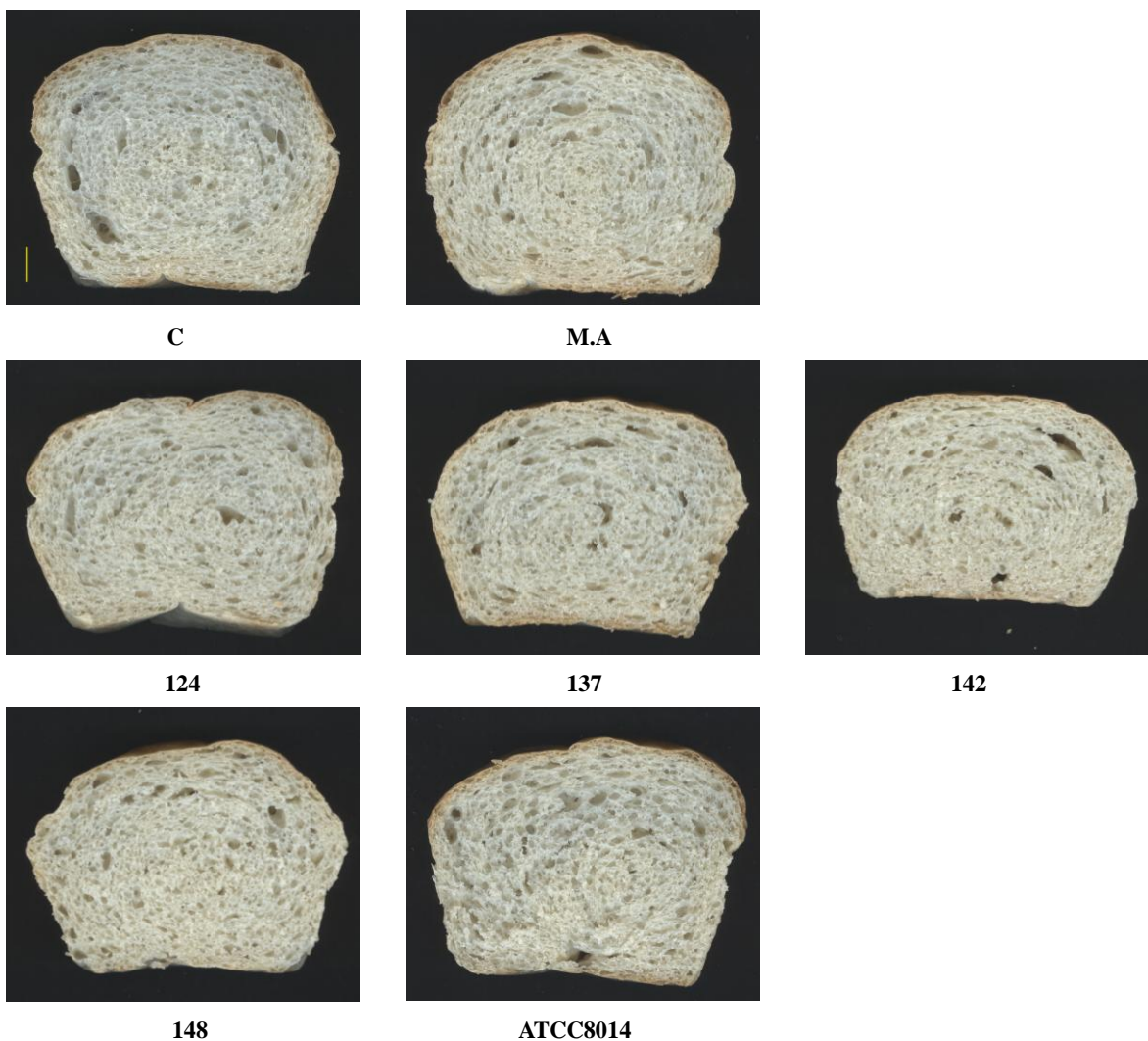


Figura 15. Fotografías de los panes elaborados con masas madre desarrolladas a partir de las cepas estudiadas. C: control sin inóculo; M.A: pan de masa químicamente acidificada; 124, 137, 142, 148 y ATCC8014: panes elaborados con las cepas en estudio. Barra: 1 cm.

En cuanto a la fracción de área de la miga ocupada por aire, los panes con masa madre y acidificada artificialmente presentaron una reducción de 39% a 29% en el contenido de aire. La cepa *L. fermentum* 142 fue similar a la M.A ($p>0,05$), en tanto que la cepa *L. plantarum* ATCC8014 presentó una FA similar al control. Los valores intermedios se pueden observar en las cepas *L. plantarum* 137, *L. fermentum* 142 y *L. pentosus* 124. En cuanto al número de alveolos/cm², en la Tabla 6 se observa que la cepa *L. fermentum* 148 muestra el mayor valor, y que *L. plantarum* ATCC8014, el menor. Valores intermedios se

pueden apreciar tanto en las cepas restantes como en ambos controles. *L. fermentum* 148, seguida por la *L. pentosus* 124 y la M.A, presentaron la mayor cantidad de alveolos/cm². Es interesante destacar que el número de alveolo/cm² tuvo una relación positiva con G* (r=0,570, p<0,05) lo que estaría indicando que estructuras más resistentes poseen un mayor número de alveolo/cm².

El tamaño promedio de alveolos fue mayor en los panes de la masa control y con la cepa *L. plantarum* ATCC8014. Los panes con *L. pentosus* 124 presentaron un aumento significativo respecto a los panes de la masa acidificada, los cuales mostraron el valor del tamaño promedio más bajo de todas las muestras. Según el análisis correlación, a medida que aumenta el valor de TA, disminuye el número de celdas/cm² (r= -0,65, p<0,05). Por otra parte, a medida que aumenta el tamaño del alveolo, el porcentaje de área ocupada por los aire es mayor (r=0,836, p<0,05).

Tabla 6. Volumen específico y estructura de la miga de los panes obtenidos con masa madre elaborada con las cepas en estudio.

Muestras	VE	FA	N/cm ²	TA
C	5,02±0,06 e	39,411±0,885 d	24,330±0,708 bc	0,0165±0,0000 d
M.A	3,79±0,05 ab	29,946±0,644 ab	25,886±0,740 bcd	0,0115±0,0004 ab
124	4,12±0,01 d	33,663±1,334 c	26,038±0,157 cd	0,0135±0,0007 c
137	3,99±0,09 cd	31,642±2,195 bc	24,043±0,164 ab	0,0133±0,0011 bc
142	3,65±0,34 a	28,139±4,640 a	24,401±0,608 bc	0,0115±0,0018 a
148	3,69±0,10 a	34,074±0,161 c	27,435±0,263 d	0,0124±0,0002 c
8014	3,91±0,15 bc	38,252±1,803 d	22,212±1,268 a	0,0176±0,0016 d

Los valores promedio fueron informados. Valores seguidos por la misma letra dentro de una columna indican que no hay diferencias significativas (p≥0,05). VE: volumen específico; FA: fracción de área; N/cm² número de alveolos por cm²; TA: tamaño promedio de alveolos. 124, 137, 142, 148, 8014: panes con el agregado del inóculo correspondiente a cada cepa; C: pan sin el agregado de inóculo; M.A: masa acidificada.

Se estudió la influencia del agregado de bacterias lácticas en la firmeza y gomosidad de la miga de pan a los días 1 y 7 luego del horneado.

Tabla 7. Gomosidad a los días 1 y 7 de panes obtenidos con masa madre elaborada con las cepas en estudio.

Muestras	Gomosidad (N)	
	Día 1	Día 7
C	1,97±0,21 a	1,64±0,24 a
M.A	3,67±0,21 d	3,59±0,10 c
124	3,09±0,58 b	2,48±0,62 b
137	3,67±0,09 d	3,76±0,06 c
142	4,71±0,78 e	5,82±2,12 d
148	3,60±0,17 cd	3,89±0,64 c
8014	3,17±0,02 bc	2,76±0,21 b

Se informan los valores promedio±desvío estándar. Valores seguidos por la misma letra dentro de una columna indican que no hay diferencias significativas ($p \geq 0,05$). C: pan sin inóculo; M.A: pan de masa acidificada con ácido láctico: acético (4:1); 124, 137, 142, 148, 8014: panes con el inóculo correspondiente a cada cepa.

Todos los panes obtenidos a partir de las muestras inoculadas y de la masa acidificada resultaron más firmes y gomosas respecto al control a los días 1 y 7 de almacenamiento. Sin embargo, la cepa *L. pentosus* 124 presentó el menor valor de firmeza y gomosidad comparada con los panes de las demás cepas y la masa acidificada. Cabe destacar que el agregado de la cepa *L. fermentum* 142 produjo panes con mayor firmeza y gomosidad tanto al día 1 como 7.

Teniendo en cuenta los resultados de reología dinámica, la obtención de estructuras de miga más firmes al día 1 está relacionada con la formación de masas de estructura más débil.

Con los valores de firmeza de los panes elaborados con las distintas cepas y los controles, se calculó la velocidad de endurecimiento como la pendiente de la recta de regresión obtenida a partir de las firmezas medidas a 1 y 7 días luego de hornear los panes. Se pudo observar una mayor velocidad de endurecimiento (Figura 16) en los panes correspondientes a la masa madre con la cepa *L. fermentum* 142. La menor velocidad de

endurecimiento se vio en los panes controles y en los elaborados con la masa madre de la cepa de *L. pentosus* 124.

Se ha observado, sin embargo, que el efecto en la calidad de almacenamiento encontrado para la masa fermentada depende de la cepa particular que realiza la fermentación y que este efecto implica dinámicas distintas de las asociadas al grado de acidificación (Corsetti y col., 1998a).

En el análisis de correlación se observó también, una relación significativa ($r=0,941$) entre la firmeza con la velocidad de endurecimiento. A su vez, panes con menor cantidad de área ocupada por alveolos (menor FA) tienen mayor firmeza y por lo tanto, una mayor velocidad de endurecimiento ($r= -0.849$, $p<0,05$). Migas con menor cantidad de aire se encuentran más densamente empaquetadas, favoreciendo una interacción más íntima entre las moléculas que la componen, aumentando la firmeza del sistema ($r= -0,567$, $p<0,05$).

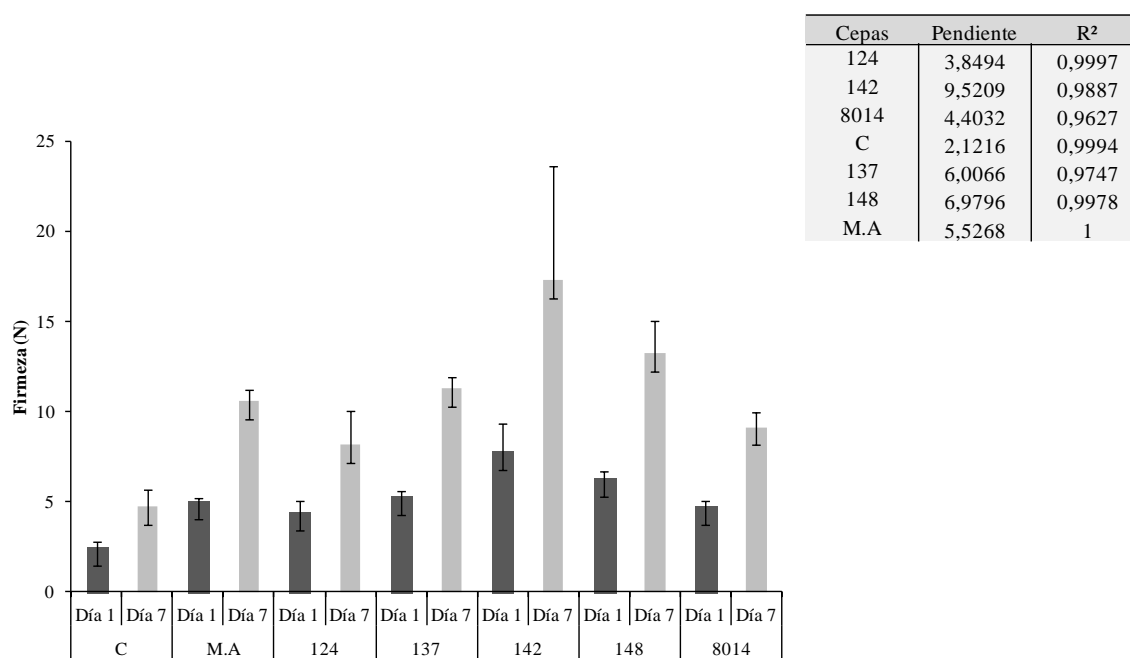


Figura 16. Firmeza de los panes a los días 1 y 7. C: pan control sin inóculo; M.A: masa acidificada químicamente; 124, 142, 8014, 137 y 148: panes con el agregado de masas madre de la cepa correspondiente. En la tabla inserta en el gráfico se expresan los valores de las pendientes que representan la velocidad de endurecimiento de los distintos panes.

A la hora de seleccionar una pieza de pan, lo primero que analiza el consumidor es el color de la corteza. La variable que más se destaca a la hora de analizar el color es el valor de L*, que es una medida de la luminosidad de las muestras estudiadas; este parámetro puede alcanzar valores de 0 a 100, donde 0 es el negro y 100 es el blanco.

En la Tabla 8 se presentan los valores de los parámetros de color para las muestras en estudio. El pan control y el elaborado con la cepa *L. pentosus* 124 mostraron el menor valor de L*, que equivale a panes con corteza más oscura.

Teniendo en cuenta la variable a* que es una medida de la intensidad del color rojo, hacia valores positivos se observan los colores rojos y para valores negativos, los verdes.

En la tabla 8 se puede apreciar que son todos positivos y que el mayor valor corresponde a la cepa *L. pentosus* 124 y el menor a *L. plantarum* ATCC8014. Por otro lado, el valor b* es una medida de la intensidad de color amarillo, hacia valores positivos se observan los amarillos, y para valores negativos, los azules. Nuestros resultados fueron todos positivos y el menor valor observado es el de la cepa *L. plantarum* ATCC8014.

Tabla 8. Influencia del inóculo de cada cepa en el pan, sobre los parámetros del color de la corteza.

Muestra	L*	a*	b*
C	57,04±2,95 a	13,77±1,24 cd	33,67±0,21 c
M.A	60,13±2,49 bc	12,82±0,95 bcd	32,39±1,04 ab
124	58,45±2,65 ab	14,11±1,205 d	33,68±0,50 c
137	61,13±0,47 bc	12,60±0,03 bc	33,64±0,25 c
142	61,38±1,75 cd	12,09±0,56 ab	33,06±0,18 bc
148	61,66±0,86 cd	12,39±0,28 b	33,47±0,04 bc
8014	64,08±3,09 d	10,94±1,70 a	31,37±0,39 a

Valores seguidos por la misma letra dentro de una columna indican que no hay diferencias significativas ($p \geq 0,05$). L*: luminosidad; a*: rojo-verde; b*: amarillo-azul. C: pan control sin el

agregado de inóculo; M.A: masa acidificada; 124,137, 142, 148 y 8014: panes de masa fermentada con el agregado de cada cepa.

Al realizar una evaluación global de la calidad tecnológica de los panes y teniendo en cuenta los resultados obtenidos de reología, se observa que el menor volumen de las piezas de pan de las muestras tratadas, podría deberse a que estas masas presentan una estructura más débil, con menos puntos de interacción o interacciones más débiles, por lo que durante la fermentación y la cocción, se retiene menos cantidad de aire. Estructuras de gluten débiles derivan en panes de poco volumen ya que la red de gluten no resulta ser lo suficientemente fuerte y estructurada como para retener el CO₂ producido durante la fermentación. En este sentido, se observó una correlación significativa ($p < 0,05$) entre el VE y los módulos G' y G* ($r = 0,55$ y $r = 0,51$, respectivamente). Se ha informado que el empleo de masas madre produce una disminución del volumen del pan (Salovaara y Valjakka, 1987; Barber y col., 1992; Rouzaud y Martínez-Anaya, 1998; Armero y Collar, 1996) y esto explicaría los valores de volumen específicos obtenidos de los panes realizados con las distintas cepas, en comparación con los panes controles. Se ha propuesto además, que la disminución del VE del pan al emplear la masa fermentada se debe principalmente a las reacciones enzimáticas que tienen lugar durante la fermentación, donde los macropolímeros del gluten son solubilizados y degradados, dando como resultado un pan de menor volumen, con una textura más suave y menos elástica (Clarke y col., 2002; Thiele y col., 2004). Un gluten más débil generalmente disminuye la retención de gas. Esto podría explicar los valores de volumen más bajos obtenidos de los panes elaborados para cada cepa con respecto al control. Sin embargo, si la acidez, así como la cantidad de otros metabolitos y la degradación del gluten, se encuentran en niveles apropiados, es posible mejorar un volumen específico utilizando la masa fermentada de trigo.

Sin embargo, en comparación con la masa químicamente acidificada, en general el empleo de masa fermentada mejoró el volumen del pan, de acuerdo a resultados publicados por Clarke y col., (2002).

Se ha reportado que la aplicación de bacterias lácticas en masas madre tiene efectos positivos sobre el envejecimiento del pan. Uno de estos efectos es una mejora en el volumen específico del pan, que se asocia con una reducción en la tasa de endurecimiento (Axford y col., 1968; Maleki y col., 1980). Estos reportes bibliográficos no coinciden con

los resultados obtenidos en los análisis de textura, pero cabe destacar que la cepa *L. pentosus* 124 presentó la menor tasa de endurecimiento después del control (Figura 15)

Se ha observado que el efecto sobre la calidad tecnológica del pan durante el almacenamiento depende de la cepa particular utilizada en la fermentación, y que este efecto implica variables distintas de las asociadas a la acidificación (Corsetti y col., 1998a).

Para finalizar, cabe destacar que, los resultados obtenidos a partir del análisis de correlación, nos fueron de gran utilidad para comprender mejor el sistema analizado.

CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

Podemos concluir en base a los resultados obtenidos, que el uso de masas madre genera cambios estructurales en la masa y en la calidad del pan, a partir de la combinación de factores resultantes de la fermentación por las bacterias lácticas. Teniendo en cuenta los parámetros estudiados, como la acidez, el metabolismo de carbohidratos, la producción de volátiles y la capacidad proteolítica, se pudo determinar que las cepas heterofermentativas presentaron un mayor espectro de sustancias volátiles, destacándose las cepas de *L. pentosus* 124 y *L. fermentum* 148 por su producción de acético. Si bien todas poseen capacidad para degradar proteínas, la mayor actividad proteolítica la presentaron las cepas *L. plantarum* 137 y *L. fermentum* 148 presentaron mayor actividad proteolítica.

Se evaluó el impacto de cada cepa sobre la reología y la calidad tecnológica de panificados observando que existe un efecto de cepa sobre la estructura de la masa que resultó en panes con diferentes propiedades.

Estos estudios preliminares permitieron reconocer ciertas propiedades dependientes de cepa que deberán considerarse a la hora de ser utilizadas como iniciadores de masas madre. En función de esto, se puede recomendar cada cepa de acuerdo a necesidades específicas que se requieran en cada caso, y según las propiedades de las materias primas con las que se trabaje. Si se cuenta con una harina que posee un gluten débil, se deberá trabajar con cepas que modifiquen en menor medida la elasticidad del sistema, como por ejemplo *L. pentosus* 124.

Como proyección de este trabajo, se propone estudiar estas cepas en combinaciones como iniciadores multicepas a fin de potenciar sus efectos deseables. Igualmente, es necesario evaluar la combinación con levaduras originales de masa madre.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Armero E and Collar C. (1996). Antistaling additives, flour type and sourdough process effects on functionality of wheat doughs. *Journal of Food Science* 61(2), 299-302.

Barber B, Ortolá C, Barber S, Fernández F. (1992). Storage of packaged white bread. *Z Lebensm Forsch* 194:442–449.

Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. (2004). *Food Chemistry*, third revised edition. Springer-Verlag, Berlin.

Bertrand D, Le Guerneve C, Marion D, Devaux MF, Robert P. (1992). Description of the textural appearance of bread crumb by video image analysis. *Cereal Chemistry*, 69: 257-261.

Brandt MJ. (2006). Bedeutung von Sauerteig für die Brotqualität. In: Brandt MJ, Gänzle MG (eds) *Handbuch Sauerteig*. B. Behr's Verlag, Hamburg, pp 21–40.

Clarke C, Schober T, Dockery P, O'Sullivan K and Arendt E.(2004). Wheat sourdough fermentation: effects of time and acidification on fundamental rheological properties. *Cereal Chemistry* 81(3), 409-417.

Clarke C, Schober T and Arendt EK. (2002). The effect of single strain and traditional mixed strain starter cultures on rheological properties of wheat dough and bread quality. *Cereal Chemistry* 79, 640-647.

Corsetti A, Gobbetti M, Balestrieri F, Paoletti F, Russi L, Rossi J. (1998). Sourdough lactic acid bacteria effects on bread firmness and staling. *J Food Sci* 63:347–351.

Corsetti A, Gobbetti B, De Marco B, Balestrieri F, Paoletti F. and Rossi J. (2000). Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48, 3044-3051.

Corsetti A, Settanni L (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40(5), 539e558.

De Angelis M, Mariotti L, Rossi J, Servili M, Fox PF, Rollàn G, Gobbetti M. (2002). Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: Purification and characterization of the arginine deiminase (ADI) pathway enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Appl Environ Microbiol* 68:6193–6201

de Man, JD, Rogosa, M, Sharpe, ME. (1960). "A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*". *J Appl Bact.* **23** (130–135)

De Vuyst L, Van Kerrebroeck S, Harth H, Huys G, Daniel H.-M, Weckx S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? *Food Microbiol.* 37,11–29.

De Vuyst, L. y Vancanneyt, M. (2007). Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiol* **24**, 120–127.

De Vuyst, L y Gänzle, M. (2005). Second international symposium on sourdough: from fundamentals to applications. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 2–3.

De Vuyst L, Neysen, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 43–56.

Di Cagno R, De Angelis M, Corsetti A, Lavermicocca P, Arnault P, Tossut P, Gallo G. and Gobbetti M. (2003). Interactions between sourdough lactic acid bacteria and exogenous enzymes: effects on the microbial kinetics of acidification and dough textural properties. *Food Microbiology* 20, 67.75.

Di Cagno, R., De Angelis, M., Lavermicocca, P., De Vincenzi, M., Giovannini, C., Faccia, M., y Gobbetti, M. (2002). Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 623–633. edition. Springer-Verlag, Berlin.

Ehrmann MA, Vogel RF. (1998). Maltose metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis*: cloning and heterologous expression of the key enzymes, maltose phosphorylase and phosphoglucomutase. *FEMS Microbiology Letters* 169, 81e86.

Foschino R, Terraneo R, Mora D, Galli A. (1999). Microbial characterization of sourdoughs for sweet baked products. *Italian Journal of Food Science*, 11, 19–28.

Gänzle MG. (2014). Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiol.* 37, 2–10.

Gänzle MG, Gobbetti M. (2013). *Handbook on Sourdough Biotechnology* Springer New York Heidelberg Dordrecht London. Library of Congress Control Number: 2012951618. . ISBN 978-1-4614-5424-3 ISBN 978-1-4614-5425-0 (eBook).DOI 10.1007/978-1-4614-5425-0.

Gänzle MG, Follador R. (2012). Metabolism of oligosaccharides in lactobacilli: a review. *Frontiers in Microbiology* 3, 340.

Gänzle MG, Loponen, J. y Gobbetti, M. (2008). Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends Food Sci Technol* **19**, 513–521.

Gänzle, M.G., Vermeulen, N., Vogel, R.F., (2007). Carbohydrate peptide, and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *FoodMicrobiology* 24,128e138.

Gassenmeier K. and Schieberle P. (1995). Potent aromatic compounds in the crumb of wheat bread (French-type)-influence of pre-ferments and studies on the formation of key odorants during dough processing. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 201, 241-248.

Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R., (2005). Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science and Technology* 16, 57e69.

Gobbetti M, Lavermicocca P, Minervini F, De Angelis M, Corsetti A (2000). Arabinose fermentation by *Lactobacillus plantarum* in sourdough with added pentosans and a -L-arabinofuranosidase: a tool to increase the production of acetic acid. *J Appl Microbiol* 88:317–324

Gobbetti, M. (1998). The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends Food Sci Technol* 9, 267–274.

Goesaert H, Brijs K, Veraverbeke WS, Courtin CM, Gebruers K, Delcour JA. (2005). Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends Food Sci Tech* 16:12–30.

Gómez Pallarés M, León AE, Rosell CM. (2007). Trigo. En: *De Tales Harinas, Tales Panes: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica*. Editado por León AE, Rosell CM. Primera edición. Córdoba, Argentina. pp. 17-73.

Gray JA, Bemiller JN. (2003). Bread staling: molecular basis and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1-20.

Hammes WP, Ganzle MG. (1998). Sourdough breads and related products. In: Woods BJB (ed) *Microbiology of fermented foods*, vol 1. Blackie Academic/Professional, London, pp 199–216.

Hammes, W. P., Brandt, M. J., Francis, K. L., Rosenheim, M., Seitter, F. H., y Vogelmann, S. (2005). Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 4–11.

Hoseney RC. (1994). Structure of Cereals. En: Principles of cereal science and technology, 2da Edición. Editado por Hoseney RC. American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota, EUA.

Katina K, Poutanen K. (2013). Nutritional Aspects of Cereal Fermentation with Lactic Acid Bacteria and Yeast. In *Handb Sourdough Biotechnol*, pp. 229–244. Edited by M. Gobbetti & M. Gänzle. Springer US.

Katina K. (2005). Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread. Espoo 2005. VTT Publications 569. 92 p. + app. 81 p.

Kawamura, Y. and Yonezawa, D. 1982. Wheat flour proteases and their action on gluten proteins in dilute acetic acid. *Agricultural and Biological Chemistry* 46, 767.773.

Lefebvre D, Gabriel V, Vayssier Y and Fontagné-Faucher C.(2002). Simultaneous HPLC Determination of Sugars, Organic Acids and Ethanol in Sourdough Proces. Laboratoire de Biologie appliquée a` l'Agroalimentaire (LBA), Département Génie Biologique – IUT Paul Sabatier, 24, rue d'Embaque`s 32000 Auch (France).

Lezcano E. (2006). Trigo y sus derivados. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Subsecretaría de Agroindustria y Mercados. Dirección Nacional de Alimentos. Ministerio de Economía y Producción- Buenos Aires, Republica Argentina.

Lindhahl L. (1990). Rheological properties in wheat flour systems. Molecular and interfacial basis. Thesis Doctoral. Lund University, Sweden.

Lorenz, K. (1983). Sourdough processes. Methodology and biochemistry. Baker's Digest, 55, 85–91.

Maher Galal A, Varriano-Marston E and Johnson JA. 1978. Rheological dough properties as affected by organic acids and salt. Cereal Chemistry 55, 683.691.

Maleki, M., Hosney, R.C. and Mattern, P.J. 1980. Effects of loaf volume, moisture content and protein quality on the softness and staling rate of bread. Cereal Chemistry 57, 138.140.

Martin, M.L. and Hosney, R.C. (1991). A mechanism of bread firming. II. Role of starch hydrolyzing enzymes. Cereal Chemistry, 68, 503.507.

Martínez-Anaya, M.A., Devesa, A., Andreu, P., Escrivá, C. and Collar, C. (1998). Effects of the combination of starters and enzymes in regulating bread quality and self-life. Food Science and Technology International 4, 425.435.

Martínez-Anaya, MA. (1996)b. Carbohydrate and nitrogen related components in wheat sourdough processes: a review. Advances in Food Science (CTML) 18(5/6), 185.200.

Matz S. (1999). Ingredients from wheat. En: Bakery Technology and Engineering. Third Edition. Editado por Matz, S. Pan-Tech Internarional, USA. 1-21.

Nionelli L, Giuseppe Rizzello C. (2016). Sourdough-Based Biotechnologies for the Production of Gluten-Free Foods Department of Soil, Plant and Food Science, University of Bari Aldo Moro, I-70126 Bari, Italy. Foods 2016, 5, 65; doi:10.3390/foods5030065

Osborne TB. (1907). Proteins of the wheat kernel. Publication of the Carnegiem Institution Washington, 84, 1-119.

Ottogalli G, Galli A, y Foschino R. (1996). Italian bakery products obtained with sour dough: characterization of the typical microflora. *Advances in Food Science*, 18, 131–144.

Paucean A, Vodnar DC, Socaci SA y Socaciu C. (2013). Carbohydrate metabolic conversions to lactic acid and volatile derivatives, as influenced by *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 and *Lactobacillus casei* ATCC 393 efficiency during in vitro and sourdough fermentation. *Eur Food Res Technol* **237**, 679–689.

Pétel C, Onno B, Prost C. (2017). Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review. *Trends in Food Science y Technology*, 59, 105–123. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.015>.

Raibaud P, Caulet M, Galpin JV, Mocquot G (1961). Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs II. Streptococci: selective enumeration and differentiation of the dominant group. *J. Appl. Bacteriol.* 24: 285-291.

Ravyts F, De Vuyst L. (2011). Prevalence and impact of single-strain starter cultures of lactic acid bacteria on metabolite formation in sourdough. *Food Microbiology*, 28(6), 1129–1139. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.03.004>.

Robert H, Gabriel V, Lefebvre D, Rabier P, Vayssier Y, Fontagné-faucher C. (2006). Study of the behaviour of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc* starters during a complete wheat sourdough breadmaking process. *LWT – Food Sci. Technol.*, v.39, n.3, p.256-265.

Röcken, W., Rick, M. and Reinkemeier, M. (1992). Controlled production of acetic acid in wheat sourdoughs. *Zeitchrift für Lebensmittel Unterschung und Forschung* 195, 259.253.

Röcken R, Voysey PA. (1995). Sourdough fermentation in bread making. *Journal of Applied Bacteriology* 79, S38eS48.

Rouzaud O and Martínez-Anaya M. (1997). Relationship between biochemical and quality-related characteristics of breads, resulting from the interactions of flour, microbial starter and the type of process. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 204, 321.326.

Salovaara H and Valjakka T. (1987). The effect of fermentation temperature, flour type, and starter on the properties of sour wheat bread. *International Journal of Food Science and Technology* 22, 591.597.

Salovaara H. (1998). Lactic acid bacteria in cereal-based products. In S. Salminen y A. von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria microbiology and functional aspects* (pp. 115–138). New York: Marcel Dekker.

Salovaara H. (2004). Lactic acid bacteria in cereal-based products. In: Salminen, S., von Wright, A. and Ouwehand, A. (eds.) *Lactic acid bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, 3rd edition, Marcel Dekker, New York, pp. 431.451.

Salvucci E, LeBlanc JG y Pérez G. (2016). Technological properties of Lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. *LWT-Food Science and Technology*, 70, 185–191.

Sapirstein HD, Roller R, Bushuk W. (1994). Instrumental measurement of bread crumb grain by digital image analysis. *Cereal Chemistry*, 71: 383-391.

Sapirstein HD. (1999). The imaging and measurement of bubbles in bread. En: *Bubbles in Food*. Editado por Campbell GM, Webb C, Pandiella SS, Niranjana, K. American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, MN. pp. 233-243.

Schober TJ, Dockery P and Arendt EK. 2003. Model studies for wheat sourdough systems using gluten, lactate buffer and sodium chloride. *European Food Research and Technology* 217, 299-304.

Siragusa S, Di Cagno R, Ercolini D, Minervini F, Gobbetti M, De Angelis M (2009) Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* starters. *Appl Environ Microbiol* 75:1099–1109

Steffe JF. (1996). Rheological methods in food processing engineering. 2° ed. Freeman Press, MI.

Steffolani ME, Ribotta PD, Pérez GT, Leon AE. (2010). Effect of glucose oxidase, transglutaminase, and pentosanase on wheat proteins: Relationship with dough properties and bread-making quality. *J Cereal Sci* 51, 366–373.

Stolz P., Böcker, B., Vogel, R.F., Hammes, W.P., (1993). Utilisation of maltose and glucose by lactobacilli isolated from sourdough. *FEMS Microbiology Letters* 109, 237e242.

Stolz P. (2003). Biological Fundamentals of Yeast and Lactobacilli fermentation in bread dough. In: Kulp, K. and Lorenz, K. (eds.). *Handbook of dough fermentations*. Marcel Dekker, New York, pp. 23-43.

Tan J, Zhang H, Gao X. 1997. SEM image processing for food structure analysis. *Journal of Texture Studies*, 28: 657–672.

Thiele C, Gänzle G. and Vogel RF. (2002). Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavour. *Cereal Chemistry* 79, 45-51.

Thiele, C., Grassi, S. and Gänzle, M. (2004). Gluten Hydrolysis and Depolymerization during Sourdough Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(5), 1307.1314.

Von Stokar, W. (1956). Der ursprung unseres hausbrotes. *Brot und Gebäck*, 10, 11–16.
von Wright, A. and Ouwehand, A. (eds.) *Lactic acid bacteria . Microbiological.*

Vogel RF, Knorr R, Müller MRA, Steudel U, Gänzle MG, Ehrmann MA (1999). Non-dairy lactic fermentations: the cereal world. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:403–411

Vrancken G, De Vuyst L, Rimaux T, Allemeersch J and Weckx S. (2011). Adaptation of *Lactobacillus plantarum* IMDO 130201, a wheat sourdough isolate, to growth in wheat sourdough simulation medium at different pH values through differential gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3406–3412.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02668-10>.

Wehrle, K. and Arendt, E. 1998. Rheological changes in wheat sourdough during controlled and spontaneous fermentation. *Cereal Chemistry* 75 (6) 882.886.

Wehrle, K., Crau, H. and Arendt, E. 1997. Effects of lactic acid, acetic acid, and table salt on fundamental rheological properties of wheat dough. *Cereal Chemistry* 74, 739.744.