

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Exactas
Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos



***Determinación de la resistencia a la contaminación fúngica,
la composición fisicoquímica, microbiológica y bromatológica
de pan dulce adicionado con kefir de agua***



JULIETA IRIQUIN

Directora: Ángela María León Peláez

Tutoras: Carolina Valiente Dmitruk y Ana Florencia Moretti

Laboratorio del Programa de Extensión en Alimentos y Salud
Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas

La Plata, 2020

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de La Plata y a todos los profesores y ayudantes de la Facultad de Ciencias Exactas por la formación que me han brindado;

A todo el grupo del PEAS (Programa de Extensión en Alimentos y Salud) por integrarme desde tan chica, dejarme ser parte de tan lindos proyectos y enseñarme tanto de la vida, más allá de cuestiones específicas de la facultad;

A todos los miembros de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas por recibirme en su lugar de trabajo, su buena predisposición y ayudarme siempre que lo necesité. A Ani, Cande y Ceci, siempre atentas;

A Angela, por haber aceptado dirigirme en esta última etapa de mi carrera, junto a Caro, por todos los conocimientos que me han brindado en este tiempo;

A Ani por su predisposición desinteresada, su tiempo, su apoyo, su enorme paciencia y su gran ayuda;

A mis papas por ser mi guía y ejemplo a seguir; junto a mi hermano, por tenerme tanta paciencia y acompañarme en cada paso que doy, brindándome su apoyo incondicional. A toda mi familia, por estar siempre a mi lado, expresando todo su cariño.

A mis primas y todas mis amigas por escucharme, aconsejarme, entenderme, aceptarme como soy y ser como hermanas; también a las chicas de la facu, por las horas de estudio y todos los momentos que compartimos en los años de carrera.

¡Muchas Gracias!

ÍNDICE

	<i>Página</i>
Índice	1
1. Introducción	
1.1 Introducción general	3
1.1.1 Antecedentes del proyecto en el cual se enmarca el trabajo final de grado	3
1.1.2 Hongos filamentosos y contaminación fúngica del pan	4
1.2 Productos fermentados	8
1.3 Kefir	9
1.3.1 Kefir de Agua	9
1.3.2 Elaboración del kefir de agua	13
1.3.3 Marco legal	14
1.3.4 Aplicación de kefir en la conservación del pan	14
1.4 Pan Dulce	15
1.4.1 Bioconservación	16
2. Objetivos	
2.1 Objetivos generales	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. Materiales y Métodos	
3.1 Gránulos de kefir y microorganismos empleados	18
3.2 Selección del sustrato de fermentación	19
3.2.1 Medición de biomasa y capacidad de acidificación del gránulo CMUNLP1	19
3.2.2 Recuento de grupos microbianos	20
3.2.2.1 Recuentos en el producto fermentado	20
3.2.2.2 Recuentos en el pan adicionado con producto fermentado	21
3.3 Preparación de la solución de trabajo de hongos	22
3.4 Elaboración del pan dulce	22
3.5 Determinación de la resistencia a la contaminación fúngica del pan dulce adicionado con producto fermentado	26
3.5.1 Determinación de la resistencia a la contaminación natural	26

3.5.2	Determinación de la resistencia a la contaminación artificial	27
3.6	Análisis físico – químico del pan dulce adicionado con producto fermentado	27
3.6.1	Determinación de proteínas totales por el método de Kjeldahl	27
3.6.2	Determinación de grasas por el método Soxhlet	29
3.6.3	Determinación de glúcidos totales	30
3.6.4	Determinación de Humedad	30
3.6.5	Determinación de Cenizas	31
3.6.6	Determinación del volumen del pan y volumen específico	32
3.6.7	Determinación de acidez titulable y pH	33
3.6.8	Determinación de las Kilocalorías	34
3.7	Análisis sensorial del pan dulce elaborado con producto fermentado	34
3.7.1	Prueba de aceptabilidad	34
3.8	Análisis estadísticos	35
4.	<i>Resultados y Discusión</i>	
4.1	Selección del sustrato a fermentar	36
4.1.1	Medición de biomasa del gránulo de kefir de agua CMUNLP1	36
4.1.2	Medición de la capacidad de acidificación del gránulo de kefir de agua CMUNLP1	40
4.1.3	Recuento de grupos microbianos en los sustratos seleccionados	43
4.2	Elaboración del pan dulce	45
4.3	Determinación de la resistencia a la contaminación fúngica del pan dulce adicionado con producto fermentado	46
4.3.1	Determinación de la resistencia a la contaminación natural	46
4.3.2	Determinación de la resistencia a la contaminación artificial	49
4.4	Análisis físico – químico del pan dulce adicionado con producto fermentado	54
4.5	Análisis sensorial del pan dulce elaborado con producto fermentado	56
5.	<i>Conclusiones</i>	58
6.	<i>Perspectivas</i>	60
7.	<i>Referencias bibliográficas</i>	61
8.	<i>Anexo 1</i>	73
9.	<i>Anexo 2</i>	76

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción general

1.1.1 Antecedentes del proyecto en el cual se enmarca el trabajo final de grado

Puente de Fierro es un barrio postergado de la ciudad de La Plata (Segura, 2011) donde habitan muchos trabajadores informales, desempleados y mujeres cabeza de familia (De Jesús, Rosa - Comunicación Personal). Entre mayo de 2015 y 2016, se registró un decrecimiento del empleo en la Provincia de Buenos Aires (PBA) del 0,4% (MTEySS, 2016) y, aunque muchos habitantes trabajan informalmente, la caída del empleo formal repercute en el informal; por lo que las jefas de hogar se vieron obligadas a aceptar ocupaciones extenuantes y mal remuneradas. Muchas fabrican productos alimenticios en sus hogares y los comercializan en ferias itinerantes o en el barrio. La posibilidad de aumentar los espacios de comercialización y la calidad de sus productos está limitada por la falta de recursos para adecuar la infraestructura donde los producen y así poder registrarse como PUPAS (Pequeñas Unidades Productivas Alimenticias), según la ordenanza 11284/15 de la Municipalidad de La Plata (Concejo deliberante de La Plata, 2015). En este marco, los niños usuarios de los comedores en dichos barrios han sido directamente afectados en los últimos años. En el contexto nacional, según las últimas estimaciones de la pobreza realizadas por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC), alrededor del 47% de la infancia reside en hogares pobres, en términos monetarios, lo que da cuenta de un incremento muy significativo de la pobreza infantil. Esta cifra confirma la especial vulnerabilidad de la infancia a la pobreza. No sólo se registra un incremento de la indigencia en la infancia de 3,3 puntos porcentuales según el último reporte oficial (INDEC, 2018 y 2019), sino que otros indicadores directos de pobreza extrema, como la inseguridad alimentaria, también registraron un incremento muy significativo entre 2017 y 2018. Por otro lado, la seguridad alimentaria se ha convertido en los últimos años en un tema central en la agenda de la industria de alimentos y, fundamentalmente, de los organismos públicos de control a nivel mundial. Según el Observatorio de la Deuda Social de la Universidad Católica Argentina, en 2018, uno de cada dos argentinos menores de edad es pobre y uno de cada diez pasa hambre, mientras que el riesgo alimentario extremo en la infancia pasó de 9,6% a 13% en el período interanual 2017-2018. En el conurbano bonaerense, la inseguridad alimentaria total pasó de 23,4% en 2015 a 35,8% en 2018 en niños de 0 a 17 años; mientras que la inseguridad alimentaria severa, que expresa haber experimentado “hambre” por falta de alimentos en los últimos 12 meses por problemas económicos, aumentó de 9,7% a 17,4%, resultando la región urbana más afectada en cuanto a este indicador. Además, más del 40% de niños y niñas recibe alimentación gratuita en

comedores, escuelas u otros espacios. Frente a este problema que, aunque se presentan los valores recientes, es de larga data, se han creado comedores asistenciales a los cuales se acude a comer y/o a recibir vianda y/o a tomar la copa de leche. En el período de cuarentena de 2020 por el COVID 19, algunos de los comedores han pasado de dar la vianda a entregar bolsones de comida a las familias usuarias (Lacunza A., 2020).

Desde 2007, la Asociación Civil sin fines de lucro "Guardería y comedor El Refugio" ha interactuado con la Facultad de Ciencias Exactas (FCE) y la Cátedra Libre en Salud y Derechos Humanos (CLSDDHH) en proyectos de extensión tales como "Kefir, un Alimento Probiótico a costo cero" y "Parasitosis en poblaciones infantiles", entre otros. Adicionalmente, desde 2014, el proyecto "Economía Social y Alimentos: Mejoramiento de la Calidad", analiza microbiológicamente y brinda asesoramiento en el control de calidad de los productos panificados que fabrican en sus cocinas y que venden en ferias y en el mismo barrio. En 2015, las productoras comenzaron a vender sus productos en el Paseo de La Economía Social de la UNLP y, en el mismo año, se aprobó la ordenanza municipal 11284/15 para registro de PUPAS. Basándose en esa ordenanza, se auditaron 3 cocinas que se agrupan alrededor de la Asociación Civil El Refugio, observando que requerían mejoras de infraestructura. En virtud de ello, en la CLSDDHH y el PEAS, se obtuvo la financiación por parte del PROCODAS-MINCYT (Resol2016-692-E-APN-MCT) para el proyecto "Mejoramiento en producción de panificados de Puente de Hierro-La Plata". El objetivo fue el mejoramiento en la infraestructura de las 3 cocinas y el desarrollo de un producto panificado que incluyera producto fermentado con gránulos de kefir de agua en su formulación como biopreservante. Este trabajo final de grado se desarrolló en el marco de dicho proyecto.

Cabe resaltar que el desarrollo de un trabajo final en este contexto hace parte de la jerarquización y curricularización de la extensión, donde los proyectos de extensión hacen parte de la actividad investigativa, docente y formativa de las y los alumnos de la FCE. Este trabajo se desarrolló tanto en los laboratorios de extensión como en el laboratorio de la Cátedra de Microbiología de esta Facultad.

1.1.2 Hongos filamentosos y contaminación fúngica del pan

Los hongos filamentosos están distribuidos ampliamente en la naturaleza y son contaminantes que pueden crecer en todo tipo de alimentos como cereales, carnes, leche, frutas, vegetales, nueces, grasas y derivados, causando el deterioro de los mismos, como así también de productos agrícolas. Las alteraciones producidas pueden ser de diferentes tipos como olores desagradables, decoloración, putrefacción y, sobre todo, producción de micotoxinas (Chelkowski, 1991; Bigelis, 1992; Gravesen y col., 1994; Tipples, 1995; Schnürer y Magnusson, 2005). Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por algunas especies fúngicas

de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Ben Taheur y col. 2019a), que son tóxicos cuando se ingieren por vía oral. Su toxicidad es variable, siendo las llamadas toxicosis o consumo crónico las más importantes para humanos. Los efectos tóxicos más importantes son diferentes tipos de cáncer y la inmunosupresión (Pestka y col., 1994; Prelusk y y col., 1994; Miller, 1991). Actualmente, se conocen más de 400 micotoxinas, siendo las aflatoxinas las más conocidas, las cuales son producidas principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, y *A. nomius* (Egal y col. 2005). Dentro de este grupo, la aflatoxina B1 (AFB1) es la más diseminada y dañina de las micotoxinas (Ben Taheur y col. 2019b) ya que es altamente tóxica y puede causar daño agudo en el hígado, cirrosis, inducir formación de tumores y generar efectos teratogénicos (Sangmanee y Hongpattarakere, 2014). La presencia de esta micotoxina, que además es termorresistente a los procesos de elaboración de alimentos, puede generar problemas de salud en humanos y animales (Ben Taheur y col. 2019a). Otro aspecto importante de las micotoxinas es que algunas son resistentes a los tratamientos físicos y químicos (Scott, 1991), por lo que el uso de materias primas mohosas ya constituye un aporte de micotoxinas al producto final. La mejor alternativa para evitar la contaminación e ingesta de micotoxinas sería evitar el crecimiento fúngico en los alimentos, donde podemos mencionar a los derivados de cereales, como el pan, entre los productos que corren mayor riesgo de sufrir esta contaminación.

Los productos de panadería son uno de los productos de mayor consumo a nivel mundial y, en general, se los considera productos perecederos. La pérdida de frescura y otros cambios organolépticos percibidos se deben a una serie de factores que, generalmente, pueden clasificarse en uno de los siguientes grupos: aquellos referidos a una serie de procesos complejos conocidos colectivamente como envejecimiento, y los que se atribuyen al deterioro microbiano (Pateras, 1998). A pesar de haber sido estudiado durante más de siglo y medio, el envejecimiento del pan no se ha eliminado y sigue siendo el responsable de enormes pérdidas económicas tanto para la industria de la panificación (deterioro de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de la imagen de la marca, etc.) como para distribuidores y consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo) (Gray y Bemiller, 2003). Datos obtenidos de panaderías de fabricación propia indican que las pérdidas ocasionadas por contaminación fúngica de panes envasados oscilan entre el 25% en invierno y el 40% en verano (Font de Valdez y col., 2008).

La causa más frecuente de deterioro microbiano en el pan es el crecimiento de hongos filamentosos. Los hongos de descomposición comunes de los productos de panadería pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Monilia*, *Mucor*, *Endomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Rhizopus* (Legan, 1993; Poute y Tsen, 1987). El deterioro debido al crecimiento fúngico es producido por la contaminación luego de la elaboración del pan: se ha demostrado que los panes recién salidos del horno no contienen hongos debido a su

inactivación térmica durante el proceso de horneado (Ponte y col., 1978). El pan es contaminado al salir del horno, por estar en contacto con las esporas fúngicas que se encuentran presentes en el ambiente donde se enfría, se corta, se empaqueta y almacena. El ambiente de las panaderías se contamina con hongos procedentes principalmente de los ingredientes secos, como la harina, que contiene esporas fúngicas que se esparcen fácilmente en el aire. Se ha estimado un recuento de $8,00 \times 10^3$ esporas/g de harina, el cual es el mismo número que se deposita en una empresa panificadora por metro cuadrado cada hora (Doerry, 1990). Las operaciones de producción, tales como pesado y mezcla de ingredientes, incrementan el recuento de hongos en el aire. En las grandes panaderías, donde se encuentran separadas las zonas de manipulación de la harina, enfriamiento y empaque del pan terminado, se puede disminuir la contaminación; sin embargo, este problema es muy común en las pequeñas panaderías (Pateras, 2007). En cuanto a los factores intrínsecos del pan que influyen en el crecimiento fúngico, debe resaltarse que la miga es relativamente seca y si la humedad ambiente está por debajo del 90%, no ocurre dicho crecimiento (Cauvain y col., 2000). Además, los hongos crecen lentamente de tal modo que, en los climas secos, la superficie de las rodajas se seca antes de que estos se hagan visibles. Sin embargo, en las atmósferas húmedas (especialmente en panes envasados) los hongos crecen rápidamente, más aún si el pan se envasa caliente ya que el agua se condensa en el interior de la superficie del empaque. Cuando se cortan las rodajas de pan, las superficies interiores (más susceptibles) se exponen a la contaminación por hongos. El pan tajado y empacado sufre mayor riesgo debido a que las superficies cortadas y húmedas son un sustrato ideal para el crecimiento fúngico ya que el envase impide la pérdida de humedad. La velocidad de crecimiento fúngico varía de acuerdo al pan y al procesamiento. A su vez, la temperatura de almacenamiento tiene un importante efecto sobre cuál será el hongo predominante en la contaminación. Por ejemplo, se reportó que el hongo dominante en panes en India era *Aspergillus* sp., mientras que el 90% de los hongos aislados en Irlanda del Norte eran del género *Penicillium* sp. (Legan, 1993).

Otras causas de descomposición del pan pueden deberse al fenómeno llamado *rope* (producido por especies de *Bacillus*) o al crecimiento de levaduras. La contaminación por levaduras es poco común en los panes de fermentación corta, pero puede ocurrir cuando se utilizan masas ácidas de largo tiempo de fermentación. Al igual que los hongos, las levaduras no resisten el proceso térmico, por lo que el pan recién elaborado no las contiene. Las principales fuentes de contaminación son por contacto directo con equipamiento sucio o alimentos con altos contenidos de azúcar, los cuales son un sustrato ideal para las levaduras osmófilas. Hay dos clases principales de levaduras que pueden afectar al pan (Legan y col., 1991): por un lado, aquellas conocidas como **levaduras fermentativas**, donde el deterioro se detecta por la presencia de un olor a alcohol o éster, dependiendo de la especie presente. Muchas levaduras son capaces de crecer en el pan y generar dicho defecto, pero *S. cerevisiae* suele ser la más común, al ser la levadura usada por los panaderos. Por otro lado, pueden encontrarse **levaduras formadoras de pseudohifas** que son conocidas generalmente

como "chalkmoulds" porque son blancas con un crecimiento expansivo en la superficie del pan, el cual puede ser confundido con hongos filamentosos. La especie más común que genera este deterioro es *Pichia burtonii*, que tiene la capacidad de crecer rápidamente en pan y ha demostrado ser más resistente a los conservantes y desinfectantes que muchos otros hongos.

Se han estudiado diferentes estrategias para prevenir o minimizar la contaminación fúngica y la producción de micotoxinas. Entre ellas, están las técnicas físicas (irradiación, sonicación, calor, altas presiones, atmósferas modificadas, pasteurización, entre otras) y las químicas (como adición de ácido propiónico y sus sales) (Legan, 1993; Pateras, 1998; Aziz y col. 2007; Adebayo y Aderiye, 2011). Sin embargo, estas alternativas presentan limitantes tales como la acumulación potencial de residuos químicos en los alimentos y el medio ambiente, así como posibles mutaciones de los hongos toxigénicos (Adebayo y Aderiye, 2011). Recientemente, se ha incrementado el interés por la aplicación de bioconservantes en la industria alimentaria. A este respecto, las bacterias ácido lácticas (BAL) y, en particular, los lactobacilos, son de especial interés ya que tienen una larga historia de uso en alimentos y generalmente se consideran seguros. Además de los ácidos orgánicos débiles, tales como ácidos láctico y acético (Röcken, 1996; Röcken y Voysey, 1995; Stiles, 1996), las BAL producen una amplia gama de compuestos de bajo peso molecular (Niku-Paavola y col., 1999), péptidos (Okkers y col., 1999) y proteínas (Magnusson y Schnürer, 2001) con actividad antifúngica. Se ha reportado la actividad antifúngica del kefir de leche contra varios hongos (Gamba y col. 2015; Ismaiel y col. 2011; Londero y col. 2014). Ismaiel y col. (2011) demostraron que el kefir inhibe el crecimiento de *A. flavus* y la síntesis de AFB1. Recientemente, Ben Tahuer y col. (2020) demostraron que el kefir de leche posee actividad antifúngica contra *A. flavus* aflatoxigénico y contra *A. carbonarius* productor de ocratoxina A-OTA (la cual está clasificado en el Grupo 2B por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como posiblemente carcinógena para los seres humanos (IARC, 1993)). Adicionalmente, se ha demostrado la producción de dipéptidos cíclicos antifúngicos: ciclo (L-Phe-L-Pro) y ciclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) a partir del cultivo de *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 (Ström y col., 2002). Se encontró que esta cepa inhibe el crecimiento de *Aspergillus nidulans* y altera la expresión de proteínas fúngicas durante los estudios de co-cultivo (Ström y col., 2005). Anteriormente, se había demostrado que los dipéptidos cíclicos son tanto antibacterianos como antifúngicos (Graz y col., 1999) y es probable que estas sustancias, que antes sólo se habían informado a partir de cepas de *L. plantarum* (Lindgren y Dobrogosz, 1990), también sean producidas por otras BAL, como por ejemplo *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus sakei* (Magnusson y col., 2003).

1.2 Productos fermentados

Ante años de malas cosechas o a la espera de cercanos períodos de carencias, el hombre siempre ha utilizado procedimientos de conservación de los alimentos: añadiendo sal o vinagre, o bien secándolos. Otras veces ha preferido la fermentación láctica y, en tiempos más modernos, ha recurrido a la congelación, la esterilización y la liofilización (Calaveras, 1996).

A través de los procesos de fermentación se buscaba, en principio, aumentar la vida útil de ciertos alimentos; y con los desarrollos tecnológicos posteriores, el ser humano ha incorporado valor agregado con el mejoramiento de las cualidades culinarias y nutritivas. Los alimentos fermentados pueden mejorar la alimentación cotidiana haciéndola equilibrada, completa y saludable. En este proceso, los microorganismos presentes en los alimentos crudos fermentan los azúcares generando texturas y sabores característicos; y, a su vez, provocan una predigestión de las proteínas, mejorando su asimilación en el organismo (Iraporda, 2010).

Entre los productos fermentados podemos mencionar: kombucha, escabeche, embutidos, salsa de soja, vino, cerveza, quesos, pan, vinagre y toda una serie de platos tradicionales tales como el *kimchi* (Corea), *pozol* (México) y el *kefir* (Iraporda, 2010; Davis, 2020).

Menos conocido pero igualmente significativo es el papel de los hongos en la fermentación de alimentos tradicionales en todo el mundo. Por ejemplo, *Rhizopus oligosporus* se usa para convertir la sémola de soja cocida en un alimento básico nutritivo, llamado *tempeh*. Esto implica un tiempo de incubación corto (24 a 36 horas), durante el cual el hongo degrada parte de la grasa y también degrada un inhibidor de tripsina en la soja, de modo que el alto contenido de proteína natural de este cultivo está más disponible en la dieta. El alimento denominado *gari* es parte de la dieta básica en el sur de Nigeria; se produce a partir del cultivo de raíces de alto rendimiento, la yuca, quizás más conocida en su forma procesada, la tapioca. La yuca cruda contiene un glucósido cianogénico tóxico denominado linamarina, que se elimina durante una fermentación prolongada, realizada de manera artesanal dentro de las comunidades indígenas y campesinas. Gran parte de este proceso involucra bacterias, pero la levadura *Geotrichum candidum* le da al producto el sabor deseado (Deacon J., 2006).

Entre las principales ventajas que pueden ofrecer los alimentos fermentados, cabe mencionar:

- 🍷 Un aumento del contenido vitamínico, especialmente en las del grupo B y C. En leche fermentada con kefir, se aumenta el contenido de vitaminas como piridoxina (vit. B6), cobalamina (vit. B12), ácido fólico (vit. B9) y biotina (vit. B7) (Ahmed y col., 2013).

- ✚ Un aumento de los aminoácidos libres (Thr, Val, Ile, Leu, Phe, His) en el kefir de leche con respecto a la leche sin fermentar (Gamba y col., 2020).
- ✚ La síntesis de vitaminas de los grupos B y K por parte de las bacterias ácido lácticas y también de metabolitos que participan en el secuestro de sustancias cancerígenas. A su vez, la presencia de dichas bacterias favorece la digestión de las proteínas y carbohidratos, acidifica el tracto intestinal e inhibe microorganismos patógenos (Iraporda, 2010).

Existe una demanda creciente a nivel global de seguridad alimentaria y, en particular, apuntando a mecanismos o estrategias de control en los inicios de la cadena de producción y elaboración de producto (Havelaar y col., 2010). En este sentido, el uso de pre y probióticos ha sido propuesto y aceptado como un mecanismo de biocontrol de bacterias patógenas causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) y hongos causantes de toxiinfecciones alimentarias (Doyle y Erickson, 2011). Además, según diversos estudios, la presencia de microorganismos probióticos ayuda a restablecer el equilibrio de la microbiota intestinal, lo que resulta beneficioso para el organismo.

1.3 Kefir

Actualmente, se conocen dos tipos de kefir: kefir de leche y kefir de agua, y los gránulos utilizados para su producción reciben el mismo nombre. El kefir de leche es un producto lácteo fermentado, tipo yogurt; mientras que el kefir de agua es una bebida carbonatada. El más difundido y conocido es el kefir de leche ya que se encuentra relativamente expandida su elaboración a nivel doméstico mediante personas que regalan los excedentes de gránulos (que crecen progresivamente) a otras. Una característica de los gránulos de kefir es que están en constante crecimiento y pueden adaptarse a distintos medios, incrementando su peso cuando se los subcultiva. Como una consecuencia del aumento de la masa microbiana y de la masa de la matriz (Garrote y col., 2001b), pronto duplican su tamaño necesitando más aporte energético y espacio (Iraporda, 2010).

1.3.1 Kefir de agua

El origen del kefir de agua es incierto, aunque existen diversas teorías al respecto (Iraporda, 2010). Se cree que es una adaptación de muchos años del kefir de leche tradicional procedente del Cáucaso, pero cultivado

en agua con azúcares o jugos de frutas. Otros autores plantean que son oriundos de México y que los gránulos originales viven en simbiosis con plantas cactáceas alimentándose de las secreciones azucaradas de las mismas. Asimismo, otras fuentes los denominan “hongos chinos” y atribuyen su origen a Japón. También se hace referencia al Tíbet (Pidoux, 1989). En relatos de la tradición oral en Colombia, se les conoce como “arroz de indio o “Indiecitos” (REGIÓN, Zapata M., 2020). Es interesante remarcar que la arqueología ha hecho un aporte al estudio de la historia de kefir, mediante un estudio de proteómica sobre un queso ancestral hallado como masa orgánica asociada a una momia en un cementerio de Xiaohe de la edad de bronce (1450 AC) en Xinjiang, China. La fermentación de kefir de leche (de animales rumiantes), mediante un cultivo simbiótico de *Lactobacillus kefiranofaciens* y otras bacterias ácido lácticas y levaduras fue la base de un producto lácteo libre de lactosa y probiótico, y fue un avance tecnológico clave en la población pastoril de Eurasia Oriental de la Era del Bronce Temprana (Yang y col., 2014). En conclusión, el kefir es muy antiguo y todavía se desconoce su origen; pero ésta es la evidencia más temprana de la que se ha tenido registro del uso del kefir.

El kefir de agua, también llamado *aquakefir* o *sugarykefir*, es una bebida fermentada, afrutada, ácida, agria y ligeramente carbonatada, con bajo contenido de alcohol y elevado contenido de ácido láctico; que se obtiene a partir de la fermentación de agua azucarada con gránulos de kefir de agua, y a la que se le puede adicionar frutas deshidratadas. La función de estas últimas es aportar aroma, sabor y regular el pH (Iraporda, 2010), además de ser la principal fuente de nitrógeno (aminoácidos de la fracción proteica), sulfuros, fósforo, vitaminas, minerales, y también aportar sacarosa (De Vuyst y col., 2019). Como las fermentaciones de kefir de agua suelen realizarse en los hogares, las condiciones de producción entre las mismas varían. Mucha gente fermenta el kefir de agua a 21 – 25 °C por 24 – 72 hs, usando entre 6 – 10% de sacarosa y 6 – 31% de gránulos de kefir de agua. (Gulitz y col., 2011, 2013; Marsh y col., 2013; Laureys y De Vuyst, 2014, 2017; Laureys y col., 2018).

En nuestro país el consumo de esta bebida no es masivo ni se produce industrialmente, sólo se consume si se pasa de mano en mano; mientras que, en algunos países de Europa, como Bélgica, se produce de manera industrial y se comercializa en el mercado (Iraporda, 2010). Asimismo, existen algunos reportes sobre la producción a escala del kefir de leche (Koutinas y col., 2005). La mayor parte de los productos derivados de kefir disponibles en los mercados de Europa, USA y Asia (Lifeway Foods Inc., Hain Celestial, Nestle S.A., Danlac Canada Inc., Danone, entre otros) se basan en microorganismos aislados del gránulo de kefir de leche.

Los gránulos de kefir de agua son pequeños (1 a 10 milímetros de diámetro), translúcidos, mucilaginosos, de estructura elástica pero que fácilmente se rompen bajo presión y pueden ser color blanco o amarillento, según la fruta que se añade en el medio de cultivo (Pidoux, 1989); su estructura es densa y homogénea y con

una superficie lisa e irregular (Iraporda, 2010). Su matriz está formada por un homopolisacárido, conocido como dextrano y producido por *L. hilgardii* (Pidoux, 1989; Waldherr y col., 2010; Laureys y De Vuyst, 2017), en la cual se encuentra inmersa una microbiota compleja que convive en forma simbiótica y es la responsable de la fermentación ácido-alcohólica (Angulo y col., 1993; Garrote y col., 2001). Aún no está claro cómo se ha mantenido el balance microbiológico por largos períodos de tiempo y es sorprendente la habilidad para fermentar medios tan pobres en fuentes de nitrógeno y factores de crecimiento (Leroi y col., 1993a). Se cree que el polisacárido que forma la matriz del gránulo juega un rol muy importante en el mantenimiento del nicho ecológico, ya que las bacterias lácticas aisladas del gránulo son incapaces de crecer en una solución simplemente azucarada. También es importante la relación simbiótica entre bacterias y levaduras que conforman los gránulos (Leroi y col., 1993a, 1993b). Una de las hipótesis plantea que las levaduras proveen vitaminas, aminoácidos y factores de crecimiento mientras que los productos del metabolismo de las bacterias son utilizados por las levaduras como fuentes de carbono y energía (Iraporda, 2010). Se ha planteado la interdependencia entre las especies microbianas para suplir aminoácidos limitantes (tales como triptofano, tirosina, metionina e histidina), sintetizándolos a partir de otros aminoácidos presentes en las frutas, tales como el glutamato y aspartato en el higo (USDA, 2018). Se considera que *L. hilgardii* podría biosintetizar los tres aminoácidos aromáticos y *L. nagelii* la L-tirosina; pero no se ha encontrado que otras especies de BAL reportadas sintetizen aminoácidos aromáticos. Estos podrían ser suministrados por las frutas y, al agotarse, por *S. cerevisiae* o, posiblemente, por *B. aquikefiri*. Asimismo, se considera que las BAL pueden depender de las frutas o de *S. cerevisiae* para suplir los requerimientos de vitaminas y cofactores. Se ha reportado que *L. hordei* y *L. nagelii* aprovechan los aminoácidos y el fosfato de piridoxal liberados por *Zygorulasporea florentina* (Stadie y col., 2013; Verse y col. 2019). En el kefir de agua, se ha determinado que *L. hilgardii*, *L. hordei/mali*, y *Candidatus O. aquikefiri* contribuyen al crecimiento de los gránulos de kefir de agua mediante la biosíntesis de dextrano a partir de sacarosa (Verse y col., 2019).

La microbiota de los gránulos de kefir es diversa y consiste en bacterias ácido lácticas (principalmente especies de *Lactobacillus*, tales como *Lactobacillus casei/paracasei*, *L. hilgardii*, y *L. nagelii*, *Lactococcus sp*, *Oenococcus sp*, *Streptococcus lactis* y *Leuconostoc mesenteroides*), ácido acéticas (*Acetobacter fabarum*- presente especialmente en fermentaciones extendidas o en fermentaciones en presencia de oxígeno- y *Gluconobacter sp*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces sp*, *Candida sp*, *Kloekera sp* y *Pichia sp*), *Bacillus* y a veces bifidobacterias, en particular *Bifidobacterium aquikefiri* (Pidoux, 1989; Pidoux y col., 1990; Magalhães y col., 2010; Gulitz y col., 2011, 2013; Marsh y col., 2013; Laureys y De Vuyst, 2014, 2017; Zanirati y col., 2015; Laureys y col., 2016, 2018; Fiorda y col., 2017; Rosa y col., 2017; Gamba y col., 2019).

Las *bacterias ácido lácticas* (BAL) son microorganismos Gram positivos, no esporulados, habitualmente inmóviles, tolerantes al ácido y fermentadores estrictos. Su denominación se debe a que son capaces de

producir ácido láctico como principal producto final de la fermentación de hidratos de carbono. En este grupo están incluidas un gran número de especies y cepas que son utilizadas en la industria de alimentos por su capacidad de acidificar y, por lo tanto, preservar de contaminantes al producto; también se emplean por su contribución a la textura y al flavor del producto final (Iraporda, 2010).

De acuerdo a Magnusson y col. (2003), la eficiencia antimicrobiana de las BAL podría explicarse por la producción de compuestos antimicrobianos, de compuestos antagónicos y la competencia por nutrientes. Entre ellos, se encuentran los ácidos orgánicos, reuterina, peróxido de hidrógeno, péptidos, compuestos fenólicos y ácidos grasos hidroxilados. Se han identificado algunos de estos compuestos con actividad antifúngica producidos por *L. plantarum* tales como ácido feniláctico, ácido 4-hidroxifeniláctico, aislados de masa ácida (Lavermicocca y col., 2000); ácidos grasos hidroxilados, ácido feniláctico, ciclo (Phe-Pro), ciclo (Phe-OH-Pro) producidos por *L. plantarum* MiLAB14 aislada de ensilados (Magnusson, 2003; Sjögren y col., 2003); ácido benzoico, metilhidantoína, mevalonolactona y ciclo (Gly-L-Leu) producido por *L. plantarum* VTT E-78076 aislado de cerveza (Niku-Paavola y col., 1999). Estos ácidos, que son generalmente reconocidos como seguros para la conservación de alimentos (El-Ziney, 1998), difunden a través de la membrana del organismo blanco en su forma no disociada y al ingresar a la célula se disocian, disminuyendo el pH intracelular y deteniendo las actividades metabólicas (Axelsson, 1990; Piard y col., 1991). Otros mecanismos han sido asociados a los ácidos orgánicos (Kabara y col., 1991): por ejemplo, se ha propuesto que los ácidos neutralizan el potencial electroquímico de la membrana celular y aumentan su permeabilidad produciendo bacteriostasis y, eventualmente, la muerte de los microorganismos susceptibles. La misma hipótesis también podría explicar la susceptibilidad de algunos hongos a los ácidos orgánicos (Batish y col., 1997), lo cual fue demostrado mediante el uso de los ácidos acético, propiónico y láctico (Eklund, 1989; León y col., 2012). Con un pKa alto, el ácido acético es más efectivo que el ácido láctico para la inhibición fúngica y su efecto se incrementa de forma sinérgica cuando se emplean juntos (Batish y col., 1997; León y col., 2012).

Las *bacterias ácido acéticas* (BAA) comprenden un grupo de microorganismos Gram negativos, móviles, ácido tolerantes, y aeróbicos que presentan la capacidad de utilizar alcoholes como fuente de carbono y energía produciendo su oxidación a ácido (bacterias suboxidantes, género *Gluconobacter*) o a dióxido de carbono y agua (bacterias superoxidantes, género *Acetobacter*). Cuando el sustrato es etanol, producen ácido acético, capacidad que las hace extremadamente acidófilas (Iraporda, 2010).

Las *levaduras* (LEV) se definen como hongos unicelulares cuyo crecimiento vegetativo resulta principalmente de procesos de gemación o fisión. La principal fuente de carbono y energía es la glucosa, pero algunas levaduras pueden utilizar fuentes de carbono no convencionales, como la lactosa, que puede ser utilizada por los géneros *Kluyveromyces* y *Cándida*, lo cual las hace útiles en la industria. Las levaduras juegan un rol

importante en la preparación de productos fermentados ya que proveen factores de crecimiento esenciales, como aminoácidos y vitaminas, cambian el pH y producen etanol y dióxido de carbono (Iraporda, 2010).

Se han determinado diferentes propiedades funcionales en el producto fermentado incluyendo aquellas antitumorales, antibacterianas, antioxidantes e hipocolesterolémicas (Rosa y col., 2017; Zamberi y col., 2016). Recientemente se reportó por primera vez la presencia de algunas especies tales como *A. indonesiensis*, *A. tropicalis*, *G. oxydans*, *L. farraginis*, *O. kitaharae* y *P. occidentalis* (Gamba y col., 2019).

1.3.2 Elaboración del kefir de agua

La preparación del kefir de agua se hace artesanalmente, inoculando los gránulos de kefir de agua en una solución de agua y azúcar, la cual puede contener también frutas. La fermentación se hace a temperatura ambiente, con una duración entre 24-48 horas, dependiendo de la estación del año y del gusto de los consumidores y, una vez finalizada, se separan mediante filtración los gránulos de la bebida fermentada, procediendo a reinocularlos en una solución fresca. La bebida está lista para ser consumida, y puede almacenarse en heladera por algunos días.

Normalmente, el kefir de agua tiene un crecimiento muy activo dependiendo del tipo de agua y las condiciones del cultivo, como la temperatura, la relación entre agua, azúcar y gránulos y la presión en el interior del recipiente. A mayor producción de dióxido de carbono y alcohol, disminuye el crecimiento del cultivo. La tasa de producción de alcohol varía dependiendo de la temperatura y de la concentración de gránulos de kefir y azúcar. El porcentaje de alcohol puede oscilar entre 0,3 - 2,0 % después de dos días de cultivo (Franzetti y col., 1998).

Durante el proceso de fermentación, algunas especies presentes en los gránulos de kefir de agua pueden pasar al medio líquido, dándole al producto final una composición determinada de microorganismos y un pH alrededor de 4. Las bacterias y levaduras se mantienen activas en el líquido dado que establecen relaciones simbióticas entre ellas (Leroi y col., 1993b).

La bebida de kefir producida a partir de soluciones azucaradas podría ser un producto beneficioso para ciertos consumidores, como los veganos, las personas intolerantes a la lactosa y las personas alérgicas a los productos lácteos. Además, es fuente de una gran variedad de especies bacterianas y levaduras con potencial efecto probiótico (Gamba y col., 2019). En virtud de que a partir de un proceso relativamente sencillo y económico se puede obtener un producto con posibles efectos beneficiosos para la salud, ha sido de interés para el grupo de investigación seguir indagando sobre sus posibles aplicaciones.

1.3.3 Marco Legal

El kefir de leche está descrito como alimento en el Código Alimentario Argentino – Capítulo VIII – ALIMENTOS LÁCTEOS - Artículo 576 - (Res MSyASN° 295, 14.04.99). (CAA, 2019). La bebida obtenida con gránulos de kefir de agua aún no se encuentra incluida en el Código Alimentario Argentino, por lo que para las determinaciones de concentración de los microorganismos que se hicieron en este trabajo, se tomaron como referencia aquellas exigidas para el kefir de leche.

1.3.4 Aplicación de kefir en la conservación del pan

Previamente, Teixeira y col. (2010) demostraron que los gránulos de kefir de agua tienen la capacidad de fermentar una solución de azúcar negra (5% p/v). Luego de una fermentación de 24 horas a 25 °C, se hallaron recuentos en el orden de 1,00 E+08 UFC/ml, 1,00 E+08 UFC/ml y 1,00 E+07 UFC/ml para *Lactobacillus*, *Acetobacter* y levaduras, respectivamente; mientras que Caro y León (2014) encontraron recuentos menores (1,00 E+07 UFC/ml, 1,00 E+06 UFC/ml y 1,00 E+06 UFC/ml para BAL, BAA y LEV, respectivamente). Ambos trabajos utilizaron como sustrato para las fermentaciones, materiales económicos y de fácil acceso (azúcar o panela –azúcar de caña menos refinado). Además, en un trabajo final realizado dentro del grupo, se estudió la capacidad fermentativa del gránulo de kefir de agua CMUNLP1 en solución de azúcar pura, miel de caña, panela y azúcar de mascabo, determinando que los mejores sustratos para la fermentación fueron miel de caña y azúcar de mascabo y el peor fue el azúcar blanco puro. A su vez, el producto fermentado pudo demostrar capacidad inhibitoria contra *A. flavus* y *A. parasiticus* (Virzi, 2017). Estudios recientes con el mismo gránulo empleado en esta tesis demostraron que este puede fermentar diferentes sustratos tales como azúcar morena, melaza purificada y melaza de alta calidad, aumentando su biomasa y reduciendo la concentración inicial de azúcares solubles; asimismo, el kefir obtenido a partir de estos sustratos mostró propiedades antibacterianas contra *E. coli*, *S. typhimurium* y *S. aureus*, además de características antioxidantes e inhibitorias sobre la enzima de conversión de la angiotensina (la cual está relacionada con la hipertensión) (Gamba, 2019).

Hasta ahora se han reportado pocos estudios sobre la capacidad antifúngica de los productos fermentados con gránulos de kefir de agua. Un estudio previo a este trabajo evaluó el efecto en la vida útil del pan elaborado con levadura panadera o con adición de kefir de agua en diferentes proporciones (1, 2 y 3 % p/p con base en la harina de trigo). En dicho estudio se determinó que la aparición de hongos filamentosos en los panes fue más temprana en aquellos elaborados con levadura (de 3-4 días) mientras que en el pan adicionado con kefir el tiempo de vida útil se prolongó de 4 a 6 días, de acuerdo a la proporción adicionada (Plessas y col, 2005). Por otro lado, existen reportes que han demostrado la actividad inhibidora sobre *A. ochraceus* por solución de panela (jugo de caña de azúcar concentrado) fermentada con gránulos de kefir de

agua CMUNLP1 (Caro y León, 2014; 2015) y la inhibición de *A. flavus* en sorgo almacenado en mini-silos con melaza fermentada con los mismos gránulos (Gonda y col., 2019).

Otros estudios se han realizado en este grupo acerca del efecto de los sobrenadantes de productos fermentados con kefir de leche sobre la producción de micotoxinas (Gamba y col., 2015; 2016a). Algunos investigadores encontraron que los productos obtenidos fermentando leche, suero de quesería y permeado de suero con gránulos de kefir de leche, tienen actividad antifúngica contra diversos hongos, tales como *A. parasiticus*, *A. flavus*, *Fusarium graminearum*, *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp, entre otros (Gamba y col., 2015; 2016a, 2016b; 2016c; Ismaiel y col., 2011; Londero y col., 2014). La producción de zearalenona (ZEA) fue inhibida totalmente sólo cuando se usaron concentraciones fungicidas de sobrenadantes de permeado de suero fermentado con kefir mientras que, a concentraciones menores de sobrenadantes, se determinó un efecto cepa-dependiente sobre diferentes aislamientos de *F. graminearum*. Por otra parte, otros investigadores han reportado la capacidad de secuestro de micotoxinas por BAL (Corassin y col., 2013; Haskard y col., 2000; Peltonen y col., 2001; Shetty y Jespersen, 2007) y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces* sp. (Diosma y col., 2014; Gamba, 2015; Pizzolitto y col., 2013; Shetty y Jespersen, 2007).

1.4 Pan Dulce

La elaboración de pan dulce fue una iniciativa de las productoras del barrio Puente de Fierro (Asociación Civil “El Refugio”), quienes deseaban obtener un producto novedoso para vender en las fiestas; por lo que la formulación que se usó en este trabajo fue aportada por ellas. No obstante, es importante señalar la definición de pan dulce que está implementada en el Código Alimentario Argentino – Capítulo IX – ALIMENTOS FARINÁCEOS- Cereales, Harinas y Derivados - Artículo 744 - (Resolución Conjunta SPRyRSN° 31/2003 y SAGPYA N° 286/2003) (CAA, 2019):

“ ... Con la denominación de Pan dulce, se entiende el producto de panificación constituido por harina, agua, huevos frescos y/o congelados y/o deshidratados, azúcares nutritivos, manteca y/o margarina y/o grasas comestibles y/o aceites hidrogenados, levaduras, sustancias aromatizantes, con o sin adición de frutas (secas, desecadas, deshidratadas, confitadas, escurridas), sal y leche; amasado mecánicamente, fermentado, moldeado y cocido al horno”.

1.4.1 Bioconservación

La bioconservación es el uso de microorganismos y/o sus metabolitos para prevenir el deterioro y aumentar la vida útil de los alimentos (Stiles, 1996). Si bien aditivos químicos como el propionato de sodio y las sales de sorbatos son permitidos actualmente, su concentración máxima para panadería es del 0,3 y 0,2 % p/p, respectivamente (European Union, 1995, 2008). En el caso del CAA, el propionato de calcio es aceptado en concentraciones menores o iguales a 0,4% p/p a pesar sus potenciales efectos neurobiológicos y carcinogénicos (Griem, 1985; Mac Fabe y col., 2007). Por tanto, la demanda de los consumidores de utilizar estrategias de biopreservación en alimentos está aumentando (Priftis y col. 2007; Shim y col. 2011).

Como ya se mencionó anteriormente en el apartado 1-b, algunas técnicas de biopreservación incluyen la utilización de péptidos antifúngicos, etanol y extractos de plantas, los cuales pueden ser adicionados en la fórmula del pan o incorporados como láminas antimicrobianas en empaques activos de pan (Axel y col., 2017).

La fermentación de masas ácidas con cepas antifúngicas de bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales se consideran ingredientes de alto potencial biológico para elaborar panes con o libres de gluten, es considerada un área de creciente interés. Se ha informado que la aplicación de las mismas, tiene efectos positivos sobre la calidad y el envejecimiento del pan de trigo (Clarke y col., 2002; Corsetti y col., 2000; Crowley y col., 2002). Estos panes contienen mayor valor nutricional, calidad e inocuidad debido al aumento en su vida útil, y responden con las demandas de los consumidores por productos que contengan menos aditivos (Axel y col., 2017).

Con base en los antecedentes desarrollados, se llevó a cabo el trabajo final de licenciatura que se presenta a evaluación. En él se estudió, luego de surgida la pregunta acerca de la capacidad fermentativa de los gránulos de kefir de agua en una solución de azúcar blanca que tuviera una fuente adicional de nutrientes, como por ejemplo las pasas de uva, la capacidad fermentativa del gránulo de kefir de agua en varios sustratos, seleccionando aquellos que permitieron alcanzar los pH más bajos para la posterior aplicación en la elaboración del pan dulce. El producto fermentado se incorporó a la fórmula del pan y, seguidamente, se evaluaron diferentes propiedades que éste aportaría al producto, tales como la resistencia a la contaminación fúngica, la composición microbiológica y sus características físico-químicas y sensoriales. La metodología seguida para este desarrollo se presenta a continuación.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

2.1.1 Determinar la capacidad antifúngica del producto fermentado obtenido con gránulos de kefir de agua CMUNLP1 y adicionado en la fabricación de un pan dulce para una asociación de productoras del barrio Puente de Fierro (Asociación Civil “El Refugio”).

2.1.2 Caracterizar la composición microbiológica, bromatológica y físico-química de pan dulce elaborado con producto fermentado.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Determinar la capacidad de formación de biomasa y acidificante del gránulo de kefir de agua CMUNLP1 en cuatro tipos de sustratos de fermentación diferentes.

2.2.2 Establecer el recuento de los grupos de microorganismos (bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y levaduras) en el producto fermentado con gránulo de kefir de agua CMUNLP1 en los sustratos evaluados que presenten mayor capacidad de formación de biomasa y de acidificación.

2.2.3 Producir pan dulce adicionado con producto fermentado con gránulos de kefir de agua CMUNLP1, en diferentes condiciones (incorporándolo en la formula y en el glasé adicionado sobre la superficie).

2.2.4 Estudiar la capacidad de resistencia del pan adicionado con el producto fermentado frente a la contaminación fúngica natural y artificial.

2.2.5 Determinar la supervivencia de los microorganismos del kefir en el pan adicionado con el producto fermentado.

2.2.6 Analizar la composición físico-química del producto panificado con y sin el agregado de producto fermentado.

2.2.7 Evaluar las características sensoriales del producto panificado con y sin el agregado de producto fermentado, entre los alumnos de la FCE.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Gránulos de kefir y microorganismos empleados

Se seleccionaron gránulos de kefir de agua CMUNLP1 ya que han sido empleados en investigaciones previas del grupo (Caro, 2012; Caro y León, 2014, 2015; Elía, 2017; Virzi, 2017). Estos gránulos fueron donados por la Comunidad Carmelita Misionera de Medellín (Colombia), quien los adquirió en la India. Se conservaron en heladera en la cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP), mediante repiques periódicos en solución de azúcar de mascabo elaborada al 4,5% p/v, manteniendo una concentración de inóculo de 10% p/v (Caro y León, 2015).



Figura 1. Gránulos de kefir de agua CMUNLP1.

Los hongos filamentosos empleados fueron *Aspergillus niger* (P1), *Penicillium* sp. (P2) y *Rhizopus* sp. (P3), los cuales fueron aislados previamente a partir de panes elaborados por las panaderas de la Asociación Civil “El Refugio” e identificados a nivel morfológico (Valiente, 2015) y a nivel molecular. Estos hongos se conservaron en agar agua (ver Anexo 1) a 4°C en la Cátedra de Microbiología de la FCE-UNLP.

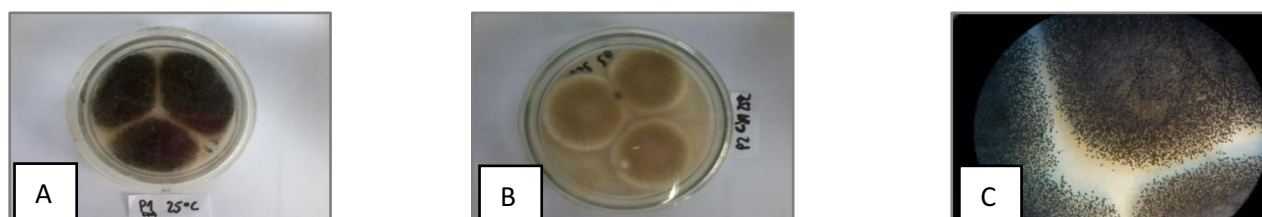


Figura 2. Hongos filamentosos empleados A) *Aspergillus niger*; B) *Penicillium* sp.; C) *Rhizopus* sp. (Tomado de Valiente, 2015).

3.2 Selección del sustrato de fermentación

Se evaluaron diferentes sustratos a fermentar por el gránulo de kefir de agua CMUNLP1 a fin de determinar el pH mínimo, la formación de biomasa y los recuentos microbiológicos obtenidos. Con estos datos se determinó el sustrato con mejores condiciones para ser empleado en la elaboración del pan dulce y en la conservación y producción de la biomasa del gránulo.

Para ello, se hicieron repiques sucesivos del gránulo CMUNLP1 (manteniendo una concentración de inóculo de 10% p/v) cada 24 horas, en los siguientes tipos de sustrato, los cuales se caracterizan por su diferente composición y valor en el mercado:

Tabla 1. Composición y nomenclatura de los sustratos evaluados.

COMPOSICIÓN DEL SUSTRATO	NOMENCLATURA EMPLEADA PARA EL SUSTRATO
Solución de azúcar blanca al 4,5% p/v en agua, adicionada de 5% p/v de pasas de uva.	AB1
Solución de azúcar blanca al 4,5% p/v en agua, adicionada de 10% p/v de pasas de uva.	AB2
Solución de azúcar blanca al 4,5% p/v en agua, adicionada de 15% p/v de pasas de uva.	AB3
Solución de azúcar de mascabo al 4,5% p/v en agua.	M

3.2.1 Medición de biomasa y capacidad de acidificación del gránulo CMUNLP1

Para analizar el cambio de biomasa, se realizaron repiques sucesivos de gránulos CMUNLP1 cada 24 horas, inoculados al 10% p/v, en los sustratos M, AB1, AB2 y AB3 durante 11 días. El ensayo se realizó por duplicado y las muestras se incubaron en estufa a 25° C. Después de cada fermentación, los gránulos fueron removidos del medio por filtración en colador de malla de 1 mm², lavados con agua destilada y secados sobre un papel absorbente hasta peso constante. Se pesaron en una balanza analítica automática PRECISA XB 220 (Control Técnica Instrumentación Científica®, Boadilla, Madrid) y se volvieron a inocular en sustrato fresco

manteniendo el porcentaje de inóculo. El cambio en la biomasa se analizó mediante curvas de Biomasa (g) vs. Tiempo (días) (Londero, 2012).

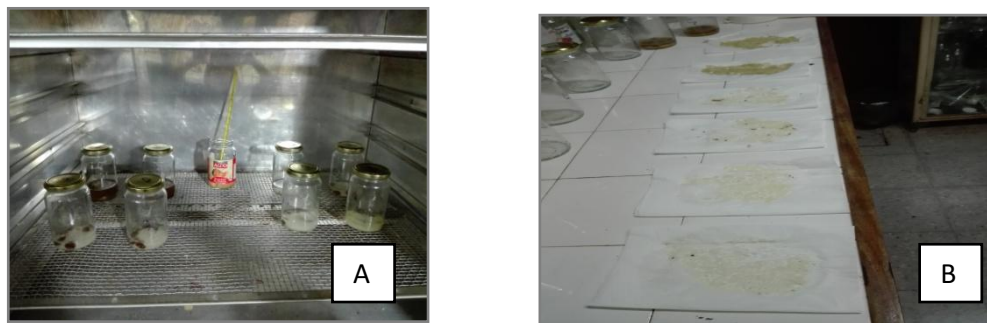


Figura 3. Repiques sucesivos del gránulo CMUNLP1 en los diferentes tipos de sustrato para evaluar el cambio de biomasa. A) Muestras incubadas en estufa a 25°C; B) Gránulos secados sobre papel absorbente hasta peso constante.

Para determinar la capacidad de acidificación, se tomó una alícuota de cada producto fermentado y se determinó el pH alcanzado a las 24 horas con pHmetro ALTRONIX TPX-III (Brooklyn, NY, U.S.A.). Este parámetro se analizó mediante curvas de pH vs. Tiempo (días) (León, 2013).

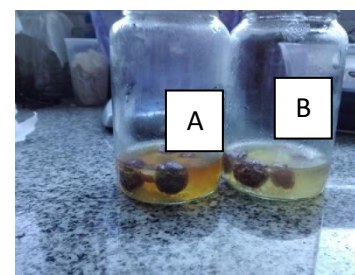


Figura 4. Producto fermentado en los diferentes tipos de sustrato luego de 24 horas, para determinar el pH alcanzado. A) Sustrato M, B) Sustrato AB1.

3.2.2 Recuento de grupos microbianos

3.2.2.1 Recuentos en el producto fermentado

Se hicieron recuentos de los grupos microbianos de bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias ácido acéticas (BAA) y levaduras (LEV) del producto fermentado obtenido con el sustrato seleccionado para incorporar en la fórmula del pan dulce y para la producción de biomasa. Para ello, se realizó un homogenizado de 10 ml de cada producto fermentado en 90 ml de agua de peptona 0,1% p/v (Oxoid, Damstadt, Alemania) (**ver Anexo 1**). A partir del homogenizado se hicieron diluciones seriadas 1/10 y se sembraron tres diluciones sucesivas en medios de cultivo específicos, enumerados a continuación:

-Agar MRS, De Man-Rogosa-Sharpe (BIOKAR, Beauvais, Francia) para las BAL.

-Agar AAB (Carr y col. 1979) (**ver Anexo 1**) para BAA.

-Agar YGC, Yeast –Glucose-Chloramphenicol (Difco, Bordeaux, Francia) para LEV.

Cien microlitros de cada una de las diluciones a sembrar se inocularon en la superficie de cada medio de cultivo y se homogenizaron con perlas estériles en cabina de flujo laminar. Todos los cultivos fueron incubados en estufa a 30°C a distintos tiempos: 24 a 48 horas en el caso de las LEV, 24 a 72 horas para BAL Y BAA. Una vez terminado el periodo de incubación, se hicieron los recuentos de microorganismos de cada producto fermentado y se expresaron como UFC/ml de producto fermentado.

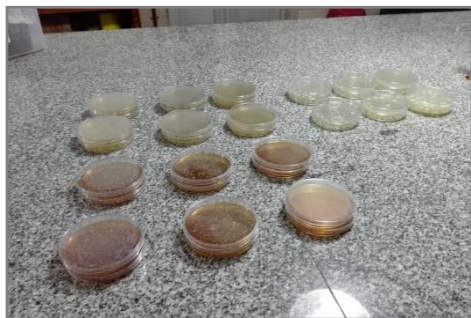


Figura 5. Medios de cultivo utilizados para el recuento de los grupos microbianos del producto fermentado.

3.2.2.2 Recuentos en el pan adicionado con producto fermentado

Se hicieron recuentos de BAL, BAA y LEV en los panes elaborados con el producto fermentado, sobre los cuales se analizó la resistencia a la contaminación natural y artificial con hongos filamentosos (**ver inciso 3.5**). Para preparar el homogenizado, se pesaron 25 g del pan utilizando una balanza digital de cocina EK3052 (Aspen®, CABA, Argentina), seleccionando porciones al azar, y se agregaron 225 ml de agua de peptona 0,1% p/v (Oxoid, Darmstadt, Alemania) (**ver Anexo 1**). La homogenización se realizó en un Bag Mixer® 400W (Interscience, Ille de France, Francia) a intensidad normal durante 60 segundos. Las diluciones, siembra e incubación en medios de cultivo se hicieron tal como se describió para el producto fermentado en el **inciso 2.2.1**.

Adicionalmente, en los panes que se valoró la resistencia a la **contaminación natural**, se hizo recuento de hongos filamentosos a los días 0, 4 y 7 de almacenamiento, empleando el medio de cultivo DRBC (Oxoid, Darmstadt, Alemania). El procedimiento se llevó a cabo según el BAM (Bacteriological Analytical Manual), inoculando por triplicado en superficie 100 µL de tres diluciones sucesivas y homogenizando con perlas en esterilidad. Las placas se incubaron en estufa a 30°C por 5 días y se hizo recuento del número de colonias crecidas en ellas.

Para valorar la resistencia a la **contaminación artificial**, se realizó la inoculación del hongo en el pan dulce y se determinó el tiempo necesario para observar la presencia del mismo. Adicionalmente a los recuentos de

BAL, BAA y LEV, se hizo la siembra del homogenizado del pan por agotamiento en medio DRBC (Biokar, Beauvais, Francia) para observación macroscópica y microscópica de los crecimientos fúngicos.

3.3 Preparación de la solución de trabajo de hongos

Cada hongo almacenado a 4°C se activó por siembra en agar papa inclinado (Biokar, Beauvais, Francia) y posterior incubación en estufa a 30°C. Una vez activado, se repicó e incubó nuevamente en agar papa inclinado a 30°C durante 4-6 días hasta esporulación, donde se procedió a obtener la solución de conidios a inocular. Para esto, se adicionaron 10 ml de solución de esporas (**Ver Anexo 1**) al cultivo fúngico seguido de un raspado suave del cultivo con ansa estéril para lograr el desprendimiento de los conidios. El recuento de conidios se hizo mediante cámara de Neubauer, previa tinción de los mismos con Tripan blue, para preparar una suspensión de concentración final de 1,00 E+04 conidios/ml (Molina y col., 1999; León Peláez y col., 2012). El volumen necesario de esta solución de trabajo se preparó el mismo día del ensayo, teniendo en cuenta el peso del pan y el volumen a aspersar sobre su superficie (León, 2013; Gamba y col., 2016).

3.4 Elaboración del pan dulce

El producto fermentado se obtuvo manteniendo una concentración del 10% p/v del inóculo en el sustrato seleccionado e incubado en estufa a 25 °C, hasta alcanzar el pH deseado. Una vez terminada la fermentación, se separó mediante un colador de malla 1 mm² y se incorporó al pan de dos formas:

- Reemplazando el agua de la fórmula.
- Mezclado en la cobertura que se le hizo al pan.

El pan dulce control se elaboró con agua potable.

El pan dulce y la cobertura se elaboraron con una fórmula propia de la Asociación Civil “El Refugio”, la cual se presenta en la tabla 2.

Los productos panificados fueron elaborados de la siguiente manera y se identificaron con el código especificado entre paréntesis:

Pan dulce control (C): Pan dulce elaborado con la formulación base, para el cual se empleó agua potable como fase líquida.

Pan dulce elaborado con producto fermentado con gránulos de kefir (K): Pan dulce elaborado con la formulación base en la que se reemplazó, en su totalidad, el agua por el producto fermentado con gránulos de kefir CMUNLP1.

Tabla 2. Ingredientes de la formulación base del pan dulce y de la cobertura.

Ingredientes	Peso (g)
Harina de Trigo (Molino Cañuelas®)	1000
Margarina (Dánica®)	125
Levadura fresca (Calsa®)	20
Sal (Dos Anclas®)	0,75
Azúcar (Vea®)	45
Leche en polvo (Vea®)	20
Fruta abrillantada*	125
Pasas de uva *	125
Nueces *	125
Agua / producto fermentado	300 ml
Para la cobertura	
Agua / producto fermentado	80 ml
Azúcar impalpable*	120

*La fruta abrillantada, nueces, pasas de uva y azúcar impalpable fueron compradas en una dietética local.

El proceso de elaboración, que es el mismo para el pan dulce C y K, se detalla paso a paso a continuación. Asimismo, puede verse el flujograma resumido del mismo en el **Anexo 2**.

Antes de la elaboración, todos los utensilios y superficies a utilizar fueron limpiados y desinfectados.

- 1. Control de las condiciones de fermentación:** Para comenzar, en el caso del pan K, se controlaron las características del producto fermentado a utilizar tales como recuentos microbianos y pH final con un pHmetro ALTRONIX TPX-III (Brooklyn, NY, U.S.A.).
- 2. Precalentamiento del horno:** Se encendió el horno de la cocina industrial CEG62V (EG®, Rosario, Argentina) a una temperatura aprox. de 190 °C.

3. **Activación de la levadura:** la levadura pesada previamente con una balanza digital de cocina EK3052 (Aspen®, CABA, Argentina), se colocó en un recipiente junto a la mitad del azúcar que lleva la fórmula y la mitad del volumen de agua/producto fermentado. Se homogeneizó con la ayuda de una cuchara y se llevó cerca del horno para que reciba calor (aprox. 10 minutos) hasta observar la generación de burbujas (Figura 6).

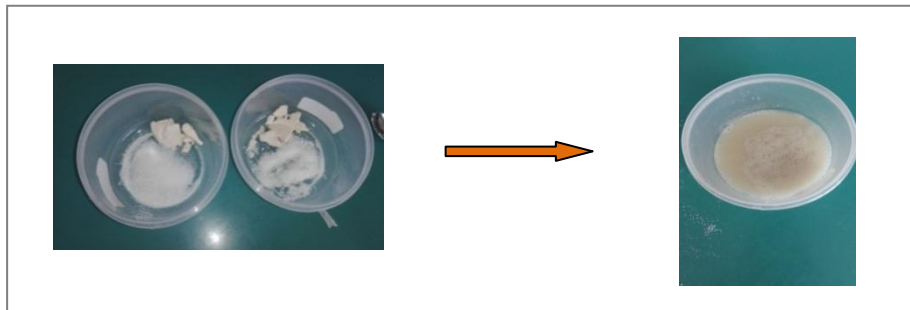


Figura 6. Activación de la levadura.

4. **Pesado y mezclado:** Luego de pesar los ingredientes con una balanza digital de cocina EK3052 (Aspen®, CABA, Argentina), se dispuso la harina en forma de corona sobre la mesada y se adicionó la leche en polvo, la sal, el resto del azúcar y, lentamente, la levadura activada. Se comenzó a mezclar con movimientos envolventes desde el centro hacia afuera y, finalmente, se agregó la margarina (Figura 7).

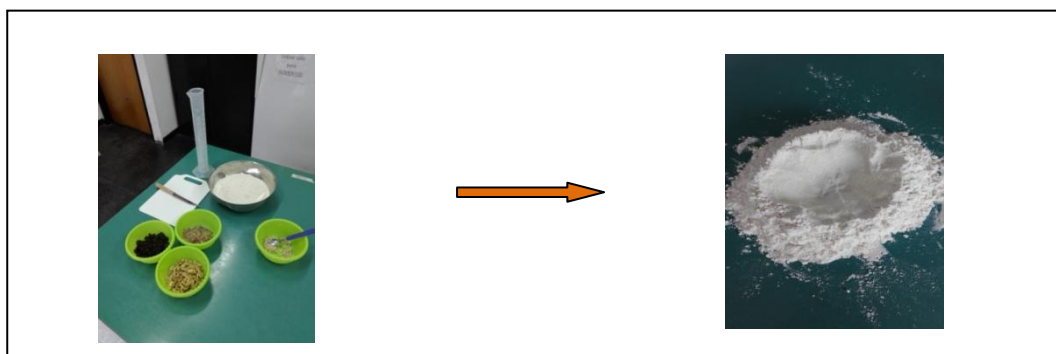


Figura 7. Pesado y mezclado.

5. **Amasado:** Se continuó con el amasado de forma tal de lograr una masa homogénea y consistente.
6. **Primera Fermentación:** Una vez terminado el amasado, se puso el bollo en un recipiente cubierto con un repasador y se dejó fermentar por 30 minutos.

7. Agregado de componentes gruesos: Se incorporaron las frutas brillantadas, las pasas y las nueces (previamente pesadas y cortadas en trocitos pequeños), y se continuó amasando hasta incorporarlas totalmente (Figura 8).

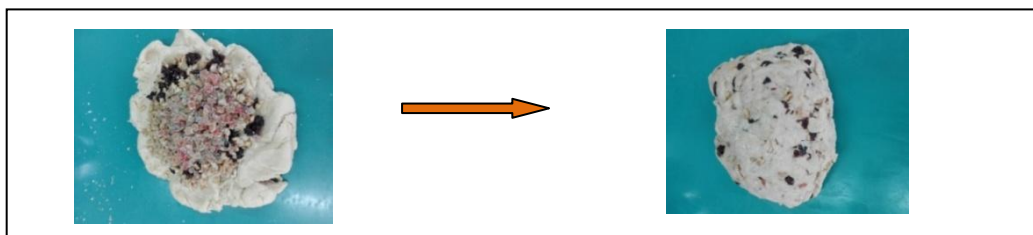


Figura 8. Agregado de componentes gruesos.

8. Segunda fermentación: Se depositó el bollo en el recipiente y se repitió el paso 6.

9. Porcionado: La masa se pesó utilizando una balanza digital de cocina EK3052 (Aspen®, CABA, Argentina) y se dividió en porciones iguales. Se amasó cada una de ellas y se colocaron dentro del molde previamente enmantecado y enharinado (Figura 9).

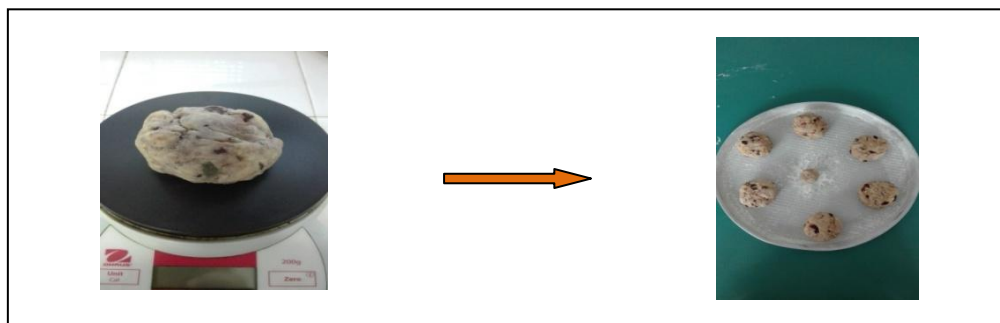


Figura 9. Porcionado.

10. Horneado: La cocción del pan se realizó durante 30 minutos.

11. Enfriamiento: Se sacó el pan dulce del horno y se dejó enfriar en la cabina de flujo laminar.

12. Adición de cobertura: La cobertura se preparó mezclando el producto fermentado/agua con el azúcar impalpable (previamente pesada) y se pinceló sobre la superficie del pan dulce a razón de 8 ml por cada pan de 75 g aproximadamente (Figura 10).

Figura 10. Adición de la cobertura.



13. Envasado: Una vez adicionada la cobertura, el pan se guardó en bolsas de polietileno estériles (Continental Plast®, Buenos Aires, Argentina) para proceder a realizar los estudios posteriores.

3.5 Determinación de la resistencia a la contaminación fúngica del pan dulce adicionado con producto fermentado con gránulos de kefir

3.5.1 Determinación de la resistencia a la contaminación natural

Tres panes elaborados con producto fermentado con gránulos de kefir y tres panes control se colocaron en bolsas de polietileno con cierre (Continental Plast®, Buenos Aires, Argentina) y se incubaron en estufa a 25°C. Se hicieron recuentos de hongos filamentosos y de grupos microbianos del kefir los días 0, 4 y 7, según la metodología descrita en el numeral **2.2.2**. Los resultados obtenidos se presentaron por cada día de análisis en tablas, expresados como UFC/g del alimento.



Figura 11. Procedimiento seguido para la contaminación natural del pan dulce: A) Pan dulce envasado en bolsa de polietileno B) Pan dulce envasado e incubado a 25°C, en estufa.

3.5.2 Determinación de la resistencia a la contaminación artificial

Tres panes elaborados con producto fermentado con gránulos de kefir y tres panes control fueron contaminados artificialmente con la solución de conidios (tal como se describe en el **inciso 3.3**). Ésta se roció sobre los panes a razón de 1 ml suspensión/100 g alimento. También se empleó un control de panes sin contaminación artificial, el cual fue rociado con agua destilada estéril para alcanzar la misma humedad que los anteriores. Cada pan contaminado y sin contaminar, se envasó en bolsa de polietileno (Continental Plast®, Buenos Aires, Argentina) y se incubó en estufa a 25°C. Diariamente, se observaron las muestras hasta la aparición de los hongos, día que se consideró el final del ensayo (Gerez y col., 2009).



Figura 12. Aspersión de la solución de conidios sobre el pan dulce para la contaminación artificial.



Una vez se dio la aparición visible de los hongos en el producto panificado, se determinaron las poblaciones de microorganismos viables del kefir de acuerdo a lo descrito en el **inciso 2.2.2**. Los recuentos se expresaron como UFC/g del producto panificado.

Figura 13. Crecimiento fúngico en el pan dulce contaminado artificialmente.

Asimismo, a fin de corroborar la presencia de los hongos inoculados, se hizo siembra por agotamiento con ansa en anillo del homogenizado del pan en medio DRBC (**inciso 2.2.2**.) y se realizó la observación macroscópica y microscópica de los crecimientos fúngicos.

3.6. Análisis físico – químico del pan dulce adicionado con producto fermentado

3.6.1 Determinación de proteínas totales por el método de Kjeldahl

Para la determinación analítica del contenido de proteínas totales, se obtiene el contenido de nitrógeno tras eliminar la materia orgánica con ácido sulfúrico calculándose, finalmente, el contenido de proteínas con ayuda de un factor de conversión.

Este método se basa en el tratamiento oxidativo de la muestra con ácido sulfúrico concentrado en presencia de una mezcla catalizadora. Se asume que el trióxido de azufre formado durante el tratamiento a altas temperaturas se adiciona como ácido de Lewis al grupo amino del enlace peptídico (base de Lewis) de la proteína para formar ácido amidosulfónico; el cual se degrada, posteriormente, a sulfato amónico. A partir de este compuesto, se libera el amoníaco por tratamiento alcalino, y se transporta por medio de una destilación en corriente de vapor a un erlenmeyer colector. Finalmente, se determina el contenido medio en nitrógeno por medio de una valoración acido-base (Matissek, Schnepel y Steiner, 2000).

Por lo tanto, para comenzar, se pesaron 2,0000 g de muestra utilizando balanza analítica AS 62.R2 PLUS (Radwag®, Radom, Polonia), los cuales se trituraron con ayuda de un mortero y se colocaron dentro del balón de Kjeldahl; además, se agregó una cucharada de catalizador (mezcla de $\text{CuSO}_4\text{-K}_2\text{SO}_4$ (J.T.BAKER®, USA)), perlas de vidrio (para reducir la formación de espuma durante el calentamiento y así evitar la posible pérdida de muestra) y 15,0 ml de H_2SO_4 98% v/v (Merck®, Darmstadt, Alemania). Se conectó el balón al resto del equipo y se calentó por 2 horas (primero de manera suave, hasta que cese el desprendimiento de espuma, y luego enérgicamente) hasta completar la digestión de la materia orgánica. Se entendió por finalizada esta primera etapa con la aparición de un color verde esmeralda traslúcido en la muestra. Se dejó enfriar y se agregaron cuidadosamente entre 100-200 ml de agua.

Para la etapa siguiente, se procedió inmediatamente a conectar la boca del matraz a una columna de destilación a fin de recoger el NH_3 volátil en un erlenmeyer con 50,0 ml de H_3BO_3 4% (Merck®, Darmstadt, Alemania) y gotas de indicador Mortimer (color rojo), conectados a la salida de la misma. Para ello, se utilizó un destilador Kjeldahl Pro-nitro M (J.P. SELECTA®, Barcelona, España), el cual agregó automáticamente 50,0 ml de NaOH 40% (Merck®, Darmstadt, Alemania) y generó la ebullición de la muestra durante 8 minutos; tiempo suficiente para que se destile la totalidad de la muestra y el indicador vire a color azul (indicando la presencia de NH_3).

En tercer lugar, se llevó a cabo la valoración del destilado con una solución de H_2SO_4 0,2 N (Merck®, Darmstadt, Alemania), hasta lograr el viraje del indicador Mortimer al color inicial rojo.

Por último, se realizó un blanco de reactivos, siguiendo las mismas indicaciones, pero sin colocar muestra en el balón.

El contenido de proteínas de la muestra se calculó teniendo en cuenta el contenido medio en nitrógeno de la proteína en cuestión, según la siguiente ecuación:

$$P \% = [(V_{\text{muestra}} - V_{\text{blanco}}) * N * 0.014 * F * 100] / W$$

Donde:

P %: porcentaje de proteína total, expresado como g/100 g de muestra.

V_{muestra}: volumen de ácido gastado en la valoración de la muestra, en ml.

V_{blanco}: volumen de ácido gastado en la valoración del blanco, en ml.

N_{ácido}: normalidad del ácido sulfúrico.

0,014: peso del miliequivalente de nitrógeno, en gramos.

F: factor de conversión de nitrógeno a proteína (6,25).

W: peso de la muestra, en gramos.

3.6.2 Determinación de grasas por el método Soxhlet

Este método consiste en una extracción de lípidos semi-continua con el solvente o mezcla de solventes orgánicos adecuada, según el tipo de grasa a extraer (Matissek, Schnepel y Steiner, 2000).

Para esta determinación, se pesaron 5,0000 g de muestra utilizando balanza analítica AS 62.R2 PLUS (Radwag®, Radom, Polonia), los cuales se trituraron con mortero y se colocaron dentro de un cartucho de papel de filtro. El cartucho se colocó dentro del tubo extractor del equipo de Soxhlet, y éste se unió a un balón, previamente pesado. Por la parte superior del tubo extractor, se agregó el solvente (éter de petróleo) y se conectó el resto del equipo. Se calentó por aproximadamente 2 horas, permitiendo que se produzcan 7 ciclos de llenado y sifonado del tubo extractor. Luego de este tiempo, se desconectó el equipo, se sacó el cartucho y se hizo una separación del solvente evaporando por calentamiento. Finalmente, se secó el balón (el cual contenía el extracto graso) en estufa por 30 minutos a 100 °C, se dejó enfriar en desecador y se pesó.

El contenido de lípidos libres de solvente orgánico se calculó con la siguiente ecuación:

$$G \% = [(m_2 - m_1)/W] * 100$$

Donde:

G %: porcentaje de grasa, expresado como g/100 g de muestra.

m₁: masa del balón vacío, en gramos.

m₂: masa del balón con grasa tras el secado, en gramos.

W: peso de la muestra, en gramos.

3.6.3 Determinación de glúcidos totales

El valor de glúcidos totales se obtuvo por diferencia respecto de los demás componentes de la muestra ("FAO / LATINFOODS. 2000. Tabla de Composición de Alimentos de América Latina") según la siguiente ecuación:

$$Glu \% = 100 - P\% - G\% - H\% - C\%$$

Donde:

Glu %: porcentaje de glúcidos totales, expresado como g/100 g de muestra.

P %: porcentaje de proteínas totales, expresado como g/100 g de muestra.

G %: porcentaje de grasa, expresado como g/100 g de muestra.

H %: contenido de agua, expresado como porcentaje.

C %: contenido de cenizas, expresado como porcentaje.

3.6.4 Determinación de Humedad

La determinación de la pérdida de humedad por el método indirecto, es decir, por elevación de la temperatura, es el método más antiguo para obtener el contenido de sustancia seca (componentes no volátiles del alimento) o el contenido de agua de un alimento (Matissek, Schnepel y Steiner, 2000).

Para ello, se pesaron 3,0000 g de muestra utilizando balanza analítica AS 62.R2 PLUS (Radwag®, Radom, Polonia) y se colocaron en una cápsula de porcelana previamente tarada, triturándose con mortero lo más finamente posible. La cápsula se introdujo en estufa a 130 °C y se dejó secar durante 1,5 horas. Luego se retiró, se dejó enfriar en un desecador y se pesó.

El cálculo del contenido de humedad se realizó según la siguiente ecuación:

$$H \% = 100 \% - SS \%$$

Siendo SS % el contenido de sustancia seca: $SS \% = [(m_3 - m_1)/(m_2 - m_1)] * 100$

Donde:

H %: contenido de agua, expresado como porcentaje.

m₁: peso de la cápsula vacía, en gramos.

m₂: peso de la cápsula más la muestra antes del secado, en gramos.

m₃: peso de la cápsula más la muestra después del secado, en gramos.

(m₂ - m₁): peso de la muestra, en gramos.

3.6.5 Determinación de Cenizas

Las cenizas son el residuo que queda tras la combustión (incineración) completa de los componentes orgánicos de un alimento en condiciones determinadas. Una vez que se eliminan otras posibles impurezas y partículas del carbono procedentes de una combustión incompleta, este residuo se corresponde con el contenido en minerales del alimento (Matissek, Schnepel y Steiner, 2000).

Por lo tanto, para la determinación de cenizas totales, se calcinó primero una cápsula de porcelana vacía a 500-550°C en mufla Furnace (STERICOX®, Delhi, India). Se dejó enfriar en desecador y luego se pesó. A continuación, se pesaron 3,0000 g de muestra utilizando balanza analítica AS 62.R2 PLUS (Radwag®, Radom, Polonia) que se colocaron en dicha cápsula y se trituraron con mortero. La misma se introdujo en estufa a 130 °C y se dejó secar durante 1,5 horas. Seguidamente, se colocó nuevamente en la mufla a 500-550°C para calcinar la muestra hasta cenizas blancas o de color gris claro y peso constante. Una vez enfriada en desecador, se calculó el contenido de cenizas según la siguiente ecuación:

$$C \% = [(m_2 - m_1) * 100] / W$$

Donde:

C %: contenido de cenizas, expresado como porcentaje.

m₁: masa de la cápsula vacía, en gramos.

m₂: masa de la cápsula con la muestra tras la calcinación, en gramos.

W: peso de la muestra, en gramos.

3.6.6 Determinación del volumen del pan y volumen específico

Esta determinación se realizó una hora después de la cocción, cuando la muestra de pan dulce ya se encontraba fría. Se empleó una probeta que se encontraba, hasta tres cuartas partes de su volumen, ocupada con semillas de sésamo. Se introdujo la muestra y se midió el nuevo volumen alcanzado por las semillas desplazadas.

Figura 14. Probeta ocupada con semillas de sésamo con la cual se midió el volumen neto del pan dulce.



El volumen específico se calculó como el cociente entre el volumen neto del pan dulce y su peso (Vega y col., 2015), según la siguiente ecuación:

$$VE = VN/W$$

Siendo VN el volumen neto de la muestra: $VN = V_f - V_i$

Donde:

VE: volumen específico, expresado como cm³/g de muestra.

VN: volumen neto de la muestra, expresado en cm³.

W: peso de la muestra, en gramos.

V_f: volumen final de la probeta, con muestra incluida.

V_i: volumen inicial de la probeta, sin la muestra.

3.6.7 Determinación de acidez titulable y pH

La determinación de la acidez titulable se basa en la titulación ácido-base del ácido láctico con una base fuerte, en presencia de un indicador de pH, generalmente fenolftaleína. Este colorante tiene un rango de viraje de 8,0 (incolore)-9,8 (rosa). En este caso, se observa que el mismo pasa de incoloro a rosado. Se da por finalizada la titulación con la aparición de la primera coloración rosa que persiste por 30 segundos (León y col., 2006).

Se pesaron 10,0 gramos de muestra utilizando balanza digital de cocina EK3052 (Aspen®, CABA, Argentina) y se homogeneizaron en 100,0 ml de agua destilada. Se tomaron 10,0 ml de dicha solución y se colocaron en un erlenmeyer junto a unas gotas de fenolftaleína. Finalmente, se tituló con una solución de NaOH 0,1 N (Merck®, Darmstadt, Alemania).

La acidez se calculó según la siguiente ecuación:

$$A = [(Vol_{NaOH} * N * P_{eq}) / (W * 100)] * 100$$

Donde:

A: Acidez titulable, expresada como g de ácido láctico por cada 100 g de muestra.

Vol_{NaOH}: volumen, en ml, de NaOH empleado en la titulación de la muestra.

N: normalidad de NaOH empleado en la titulación de la muestra.

P_{eq}: peso equivalente del ácido láctico.

W: peso de la muestra, en gramos.

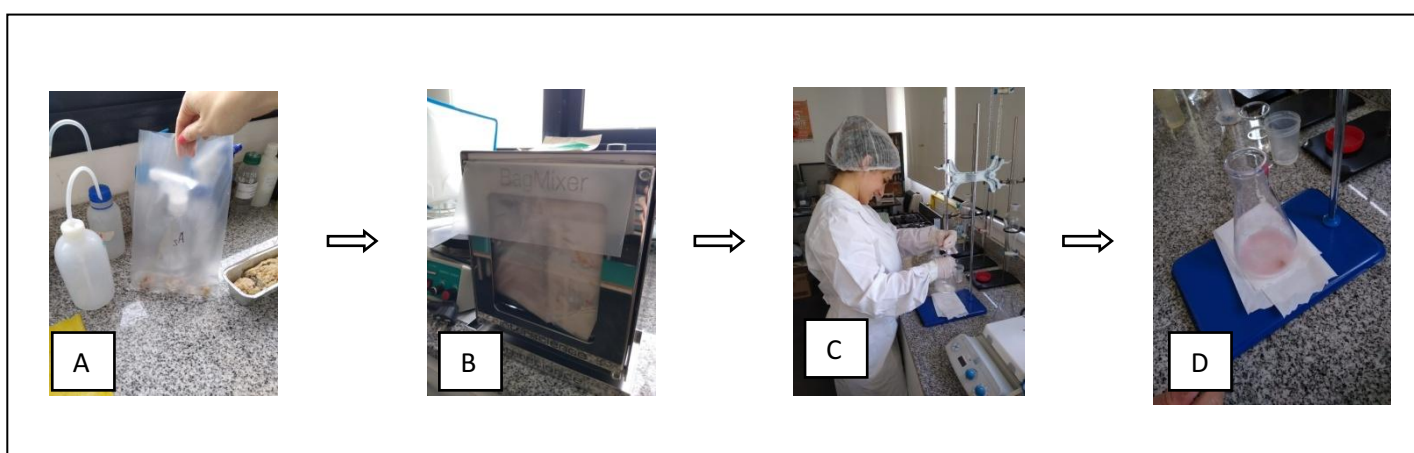


Figura 15. A) y B) muestran la preparación del homogeneizado a utilizar en la titulación. C) y D) muestran la titulación.

Para la determinación de pH, se tomó una alícuota del homogenizado (10,0 gramos de la muestra en 100,0 ml de agua destilada) y se midió el pH con un pHmetro ALTRONIX TPX-III (Brooklyn, NY, U.S.A.) (Gamba y col., 2016).

3.6.8 Determinación de las Kilocalorías.

La energía se expresa en kilocalorías (kcal) y todos los valores han sido calculados a partir de los componentes productores de energía usando los factores de conversión de: 4 kcal/g para proteínas y carbohidratos y 9 kcal/g para lípidos. La suma de los componentes se ha ajustado exactamente a 100 por cada 100 g de porción comestible o 100 ml ("FAO / LATINFOODS. 2000. Tabla de Composición de Alimentos de América Latina").

Por lo tanto, el cálculo de las kilocalorías se realizó según la siguiente ecuación:

$$\text{Kcal} = (\text{P}\% * 4) + (\text{Glu}\% * 4) + (\text{G}\% * 9)$$

Donde:

Kcal: kilocalorías expresadas por cada 100 gramos de muestra.

P %: porcentaje de proteína total, expresado como g/100 g de muestra.

Glu %: porcentaje de glúcidos totales, expresado como g/100 g de muestra.

G %: porcentaje de grasa, expresado como g/100 g de muestra.

3.7. Análisis sensorial del pan dulce elaborado con producto fermentado

Se comparó el producto de panificación con y sin el agregado del producto fermentado seleccionado, a partir de un ensayo de aceptabilidad (Hough, 2011).

3.7.1 Prueba de aceptabilidad

En este ensayo se evaluó la aceptabilidad global del pan dulce adicionado con producto fermentado con gránulos de kefir. Para ello, se pidió a los consumidores que puntuaran cada muestra del 1 al 10, donde "10"

indica que el producto les agradó mucho y “1” que no les agradó. Cada consumidor probó dos panes en total, uno elaborado con producto fermentado con gránulos de kefir (K) y otro con agua (C). Primero debían probar uno, calificar, tomar agua para neutralizar el sabor y luego, probar la siguiente muestra. Cada pan tenía un código de tres cifras y cada dupla estaba ordenada al azar (Hough, 2011). Además, se les preguntó si comprarían el producto.

Todas las respuestas fueron volcadas en la siguiente planilla (Figura 16).

<p>A continuación, usted va a probar dos porciones de pan, tomando agua entre cada pieza. Le solicitamos que le asigne a cada muestra un puntaje de 1 a 10, donde 1 es “no me gusta nada” y 10 es “me gusta muchísimo”.</p>		
Nro. Muestra	Puntaje entre 1 y 10	¿Compraría este producto? (marque con una cruz la respuesta deseada)
		Sí: No:
		Sí: No:
<p>Comentarios (opcional):</p>		

Figura 16. Prueba de aceptabilidad: planilla para el panelista.

3.8. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre los datos obtenidos se determinaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de rango múltiple (Tukey) a un nivel de significancia del 5% ($p < 0,05$). Para ello se utilizó el programa estadístico SigmaStat versión 3.5 (Systat Software Inc. San José, California).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Selección del sustrato a fermentar

Se evaluó la fermentación del gránulo de kefir de agua CMUNLP1 en los sustratos M, AB1, AB2 Y AB3, teniendo en cuenta el pH mínimo obtenido, la mayor formación de biomasa y los recuentos microbiológicos. Para ello, se hicieron repiques sucesivos del gránulo (manteniendo una concentración de inóculo de 10% p/v) cada 24 horas, incubando en estufa a 25°C. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

4.1.1 Medición de biomasa del gránulo de kefir de agua CMUNLP1

Para analizar el cambio de biomasa, se realizaron repiques sucesivos cada 24 horas en los sustratos M, AB1, AB2 Y AB3, durante 11 días consecutivos. El ensayo se realizó por duplicado y las muestras se incubaron en estufa a 25° C. El peso obtenido en cada tratamiento, entre el día 0 y 11, se observa en la siguiente tabla (Tabla 3):

Tabla 3. Cambio de biomasa del gránulo de kefir de agua CMUNLP1 cultivado en los sustratos M, AB1, AB2 y AB3 *.

Día	Biomasa (g)			
	M	AB1	AB2	AB3
0	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
1	3,94 ± 0,03	3,82 ± 0,18	3,78 ± 0,03	3,87 ± 0,04
2	4,60 ± 0,05	4,01 ± 0,09	3,90 ± 0,06	3,89 ± 0,10
3	5,33 ± 0,04	4,09 ± 0,10	3,88 ± 0,25	3,85 ± 0,33
4	6,51 ± 0,04	4,21 ± 0,27	3,95 ± 0,14	3,86 ± 0,53
5	7,66 ± 0,11	4,39 ± 0,44	4,01 ± 0,23	3,80 ± 0,58
6	8,91 ± 0,09	4,61 ± 0,71	4,06 ± 0,20	3,74 ± 0,61
7	10,33 ± 0,01	4,74 ± 0,74	4,14 ± 0,09	3,68 ± 0,55
8	11,42 ± 0,01	4,74 ± 0,74	4,09 ± 0,02	3,47 ± 0,64
9	13,19 ± 0,27	5,02 ± 0,54	4,31 ± 0,21	3,49 ± 0,65
10	15,40 ± 0,26	5,19 ± 0,34	4,41 ± 0,30	3,38 ± 0,67
11	17,88 ± 0,17 ^a	5,24 ± 0,32 ^b	4,64 ± 0,42 ^{b,c}	3,28 ± 0,70 ^c

*Los tratamientos fueron realizados por duplicado y los pesos se tomaron cada día de repique del gránulo. Los repiques se hicieron durante 11 días consecutivos. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los sustratos evaluados ($p < 0,05$).

En base a los valores de la tabla anterior, se observa el incremento de biomasa gráficamente en la figura 17:

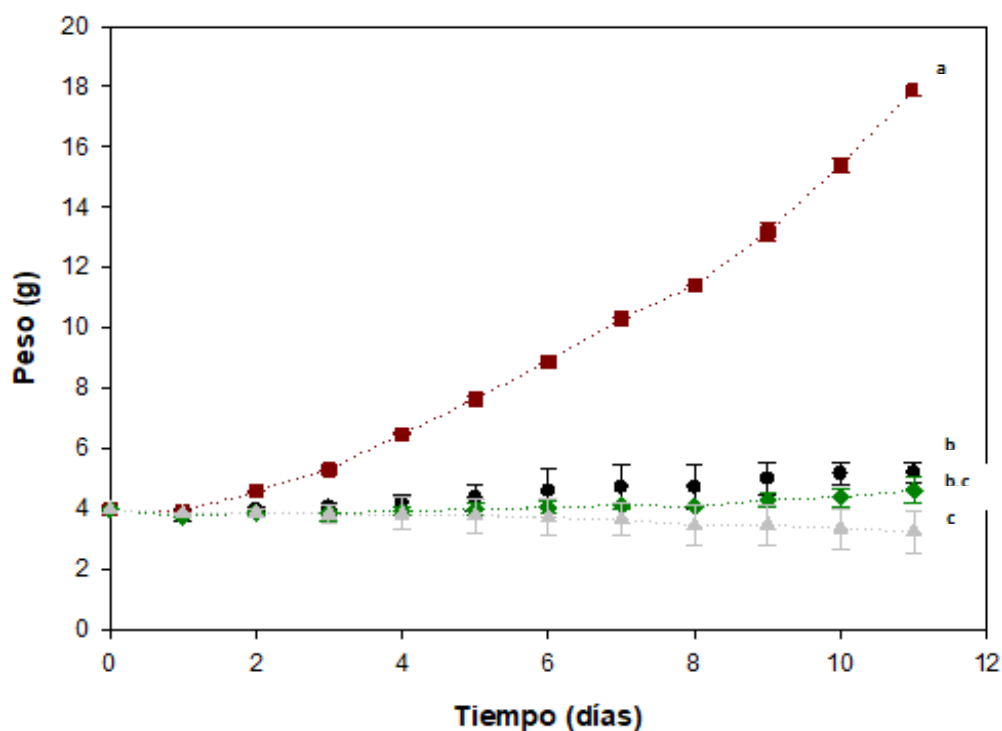


Figura 17. Cambio de biomasa del gránulo de Kefir de agua CMUNLP1 cultivado en los sustratos M, AB1, AB2 Y AB3*. ●: Peso de gránulos de kefir CMUNLP1 en sustrato AB1. ◆: Peso de gránulos de kefir CMUNLP1 en sustrato AB2. ▲: Peso de gránulos de kefir CMUNLP1 en sustrato AB3. ■: Peso de gránulos de kefir CMUNLP1 en sustrato M. * Los tratamientos fueron realizados por duplicado y los pesos se tomaron cada día de repique del gránulo. Los repiques se hicieron durante 11 días sucesivos. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los sustratos evaluados ($p < 0,05$).

De acuerdo a los resultados presentados, tanto en la figura 17 como en la tabla 3, puede apreciarse que los gránulos cultivados en el sustrato M tuvieron un aumento de biomasa superior significativamente ($p < 0,05$) al obtenido cultivándolos en los sustratos AB1, AB2 Y AB3, demostrando un incremento de alrededor de 4,5 veces su peso inicial entre el día 1 y el 11. Esto pudo deberse, en parte, a que los gránulos del cultivo M ya provenían de ser conservados en azúcar de mascabo, es decir, ya se encontraban adaptados al medio y no requirieron de tiempo para ello, aumentando así su biomasa día a día. A diferencia de los gránulos inoculados en la solución M, la biomasa de los gránulos provenientes de los cultivos AB1, AB2 y AB3 aumentó alrededor de 1 vez, observándose una diferencia significativa entre AB1 Y AB3; mientras que entre

AB1 y AB2, y, AB2 y AB3 no hubo diferencias significativas al final del período evaluado. En este caso, el cambio de medio de cultivo (azúcar blanca con el agregado de pasas de uva) hizo necesaria la adaptación de los gránulos al mismo. Esto puede notarse en las curvas del gráfico, las cuales presentaron una disminución en el valor de la biomasa respecto al valor inicial y luego, paulatinamente, comenzaron a aumentar. En los cultivos AB1 y AB2, luego de adaptarse, los gránulos crecieron de forma gradual del día 1 al 11. Para el cultivo AB3, tuvo lugar un descenso gradual en la biomasa a partir del día 6. Puede considerarse que la diferencia entre AB1 y AB3 puede deberse a la concentración de pasas agregada que, al haber aumentado entre el 5 y 15% p/v, afectó negativamente el aumento de biomasa.

Con respecto a la influencia de los sustratos, debe tenerse en cuenta la composición de éstos. El azúcar de mascabo y el azúcar blanco provienen de la caña de azúcar, pero la primera no es refinada, sino integral. Su fabricación implica la cocción del jugo de caña hasta su cristalización, con residuo de melaza incluido. Una vez evaporado todo el líquido, se obtiene un bloque sólido, cristalizado, que se muele y se convierte en azúcar de mascabo. El olor y gusto son particulares y su textura es pegajosa, producto de la humedad contenida.

Al no ser refinado, este azúcar conserva algunos nutrientes, en especial minerales propios del jugo de caña, tales como magnesio, hierro, calcio, potasio, y algunas vitaminas del complejo B; además de antioxidantes, tales como zinc y selenio, los cuales se observan en la tabla 4. Este aporte adicional de nutrientes pudo haber generado un mayor crecimiento de la biomasa del gránulo.

En la tabla 4, se muestra la composición del azúcar blanco y de las pasas de uva, las cuales fueron adicionadas en los sustratos AB como una estrategia de incorporación de nutrientes al medio de cultivo; aunque, al parecer, el aumento gradual en su concentración inhibió el crecimiento de la biomasa del gránulo.

Tabla 4. Composición nutricional de azúcar blanco, azúcar de mascabo y pasas de uva*.

Componentes	Azúcar Mascabo	Azúcar Blanca	Pasas de uva
Kcal	390,00	408,00	275,00
Hidratos de Carbono (g)	97,60	100,00	69,30
Glucosa	5,64	0	34,50
Fructosa	0,43	0	34,80
Sacarosa	91,52	99,80	1,00
Proteínas (g)	0	0	2,60
Grasas (g)	0	0	0,50
Fibra (g)	0	0	6,70
Agua (g)	2,40	0,20	21,20
Vitaminas (mg)			
Vit. A	0	0	5,00
Vit. B1 - Tiamina	0,01	0	0,12
Vit. B2 - Riboflavina	0,01	0	0,06
Vit. B3 - Niacina	1,00	0	0,68
Vit. B6 - Piridoxina	0,02	0	0,25
Ac. Fólico	1,00	0	9,00
Vit. C	0	0	4,00
Carotenoides	0	0	30,00
Minerales (mg)			
Sodio	40,00	0,30	21,00
Calcio	85,00	1,00	40,00
Hierro	1,90	10,00	2,40
Magnesio	22,00	0,20	41,00
Fósforo	24,00	0,30	111,00
Potasio	320,00	2,20	782,00
Selenio	1,20	0,60	7,30
Zinc	0,10	0,10	0,25
Yodo (µg)	0,00	5,00	0,00

*Los valores se dan en base a 100 g de producto. Los mismos fueron tomados de www.composicionnutricional.com/alimentos

Se sabe que el polisacárido de gránulo de kefir de agua consiste en un polímero de unidades de glucosa unidas por enlaces α 1-6, conocido como dextrano, producido por ciertas especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (Pidoux y col., 1988; Pidoux M., 1989; Galli y col., 1995; Horisberger M., 1969; Pidoux y col., 1990; Waldher y col., 2010), que es capaz de retener agua durante el proceso de fermentación (Garrote y col., 2001; Giraffa, 2004). Por lo tanto, si el crecimiento de algunos de estos grupos bacterianos se limita, se verá afectado el crecimiento del gránulo. Es decir, la reducción en el crecimiento del gránulo en los sustratos AB, podría deberse a una limitación en el crecimiento de algunas de las bacterias responsables de la formación del exopolisacárido. La inhibición bacteriana podría ser causada por el ácido producido en la

misma fermentación o por la pobreza en nutrientes del sustrato, que no logra ser lo suficientemente resuelta por la adición de pasas de uva. Esto podría llevar, finalmente, a la interrupción del crecimiento del gránulo.

4.1.2 Medición de la capacidad de acidificación del gránulo de kefir de agua CMUNLP1

Para determinar la capacidad de acidificación del gránulo de kefir de agua CMUNLP1 en cada sustrato, se tomó una alícuota después de 24 horas de fermentación y se determinó el valor de pH obtenido. También se determinó el pH inicial de cada sustrato antes de ser inoculado. Los resultados se muestran en la tabla 5:

Tabla 5. pH obtenido al finalizar cada período de fermentación de los sustratos M, AB1, AB2 y AB3, fermentados con gránulos de kefir de agua CMUNLP1*.

DÍA	pH			
	M	AB1	AB2	AB3
1	4,18 ± 0,00	3,83 ± 0,07	3,88 ± 0,05	3,95 ± 0,05
2	4,31 ± 0,01	3,75 ± 0,17	3,77 ± 0,07	3,65 ± 0,25
3	3,78 ± 0,03	3,33 ± 0,01	3,46 ± 0,00	3,56 ± 0,03
4	3,71 ± 0,01	3,30 ± 0,04	3,45 ± 0,07	3,50 ± 0,01
5	3,67 ± 0,01	3,25 ± 0,04	3,33 ± 0,04	3,43 ± 0,06
6	3,59 ± 0,01	3,24 ± 0,04	3,31 ± 0,06	3,37 ± 0,03
7	3,64 ± 0,02	3,21 ± 0,00	3,37 ± 0,04	3,41 ± 0,03
8	3,68 ± 0,01	3,24 ± 0,02	3,37 ± 0,05	3,45 ± 0,04
9	3,70 ± 0,01	3,27 ± 0,03	3,32 ± 0,01	3,41 ± 0,08
10	3,65 ± 0,01	3,24 ± 0,06	3,33 ± 0,09	3,41 ± 0,08
11	3,68 ± 0,01 ^a	3,31 ± 0,07 ^b	3,37 ± 0,02 ^b	3,41 ± 0,10 ^b

* Los sustratos fueron inoculados con gránulos de kefir de agua al 10% p/v y se incubaron en estufa a 25°C durante 24 horas. Al terminar cada período, los gránulos se colaron y se reinocularon en un sustrato fresco. El pH se tomó a cada producto fermentado durante 11 días consecutivos. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los sustratos evaluados ($p < 0,05$).

En base a los valores de la tabla anterior, se presenta gráficamente el valor del pH tomado cada 24 horas para cada sustrato (Figura 18).

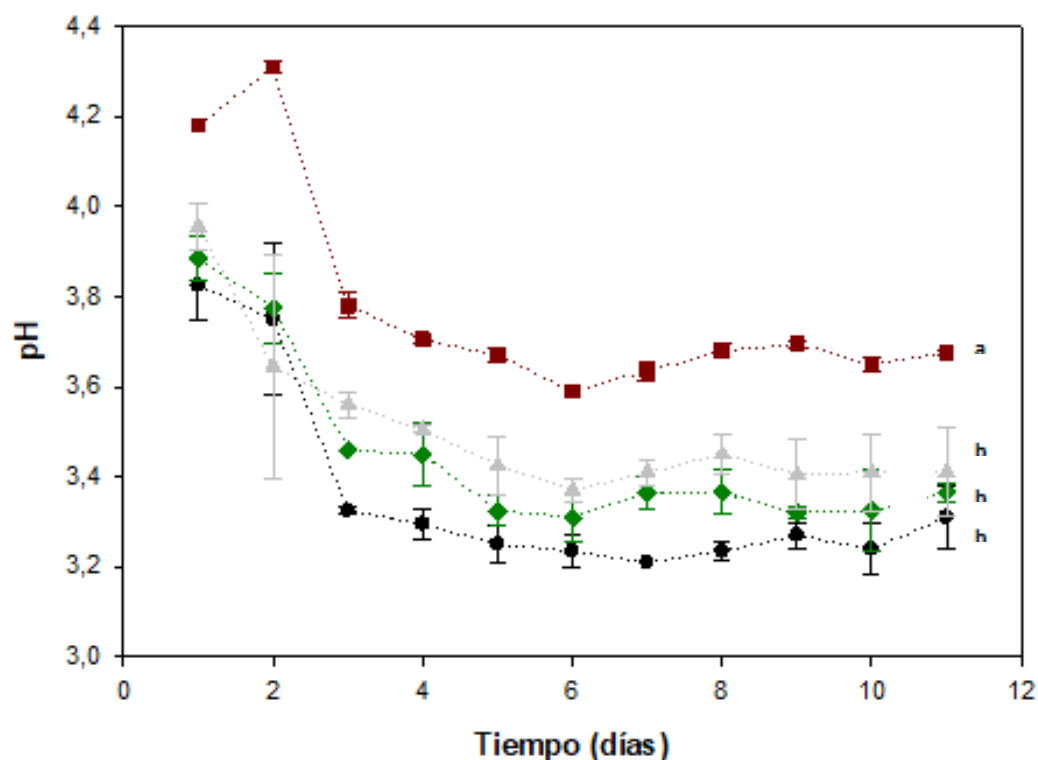


Figura 18. pH obtenido al finalizar cada período de fermentación de los sustratos M, AB1, AB2 y AB3, fermentados con gránulos de kefir CMUNLP1*. ●: pH al finalizar cada período de fermentación en sustrato AB1 ◆: pH al finalizar cada período de fermentación en sustrato AB2. ▲: pH al finalizar cada período de fermentación en sustrato AB3. ■: pH al finalizar cada período de fermentación en sustrato M. *Los sustratos fueron inoculados con gránulos de kefir de agua al 10% p/v y se incubaron en estufa a 25°C durante 24 horas. Al terminar cada período, los gránulos se colaron y se reinocularon en un sustrato fresco. El pH se tomó a cada producto fermentado durante 11 días consecutivos. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los sustratos evaluados ($p < 0,05$).

Observando las curvas de variación de pH de la figura 18, acompañadas por los datos de la tabla 5, podemos corroborar, en primera instancia, que los gránulos de kefir de agua CMUNLP1 acidifican todos los sustratos ya que se registró un descenso de pH en todos los tratamientos a partir de un valor inicial de 6,5 para M y 6,8 para los sustratos AB, hasta un valor de pH cercano o inferior a 4 a las 24 horas. A su vez, el pH final de cada sustrato fue disminuyendo a lo largo de los 11 días del ensayo; aunque después del día 6-7, el mismo se mantuvo aproximadamente constante en el último valor alcanzado para todos los cultivos.

A partir de estos valores, se determinó que los sustratos compuestos por azúcar blanca y pasas lograron mayor descenso de pH que el sustrato compuesto por azúcar de mascabo. A partir del día 3 de repique, se encontró que todos los sustratos alcanzaron un pH inferior a 4,0 a las 24 horas de fermentación. Para el día 6-7 (momento en el que los valores de pH finales comienzan a estabilizarse), la diferencia de pH entre ambos tipos de sustratos fue de 0,4.

El sustrato compuesto por azúcar de mascabo (M) alcanzó el pH más alto, es decir tuvo el menor descenso. Le siguió en valor de pH decreciente, el pH alcanzado por el sustrato AB3, seguido del sustrato AB2 y finalmente, alcanzó el menor valor de pH el sustrato AB1; el cual, a su vez, tuvo mayor aumento de biomasa con relación a los sustratos AB2 y AB3.

Recientemente, Sirakou y col. (2019) reportaron los resultados de la acidificación de tres sustratos diferentes, siendo uno de ellos solución de azúcar morena elaborada al 5,03 % p/v de azúcares solubles. El valor de pH del producto tras 24 horas de incubación a 25 °C descendió de $6,10 \pm 0,01$ hasta $4,10 \pm 0,01$. Nuestros resultados coinciden en la capacidad de los gránulos de acidificar el medio, pero logramos obtener un mayor descenso de pH (por debajo de 4,00) para todos los sustratos a partir del día 3 de subcultivo. Lo anterior pudo deberse a que trabajamos con el inóculo al 10 % p/v (peso húmedo), mientras que en dicha publicación se empleó un inóculo a la mitad de concentración (5 % p/v).

Como se discutió anteriormente, en general, los sustratos AB alcanzaron menor pH que el sustrato M, lo cual se podría atribuir posiblemente a que poseen mayor concentración de azúcares fermentables aportados por las pasas de uva. Al respecto, otros investigadores compararon la concentración original de azúcares y el pH final obtenido cuando fermentaron tres tipos de sustratos con gránulos de kefir: solución de azúcar morena, néctar de cereza y jugo natural de manzana. Las concentraciones iniciales de azúcares fermentables fueron de 5,03, 13,20 y 9,20 % p/v, respectivamente, y los pH finales fueron descendiendo de acuerdo a la concentración de azúcares: $4,10 \pm 0,01$; $3,50 \pm 0,02$; $3,70 \pm 0,01$ (Sirakou y col., 2019). Si bien en este trabajo final de licenciatura no se determinaron las concentraciones totales de azúcares fermentables, las soluciones se hicieron al 4,5 % p/v de azúcar blanca o de mascabo y la adición de pasas a las soluciones de azúcar blanca pudo haber aportado mayor cantidad de azúcar fermentable favoreciendo un menor pH con respecto a la solución M.

La acidificación de los sustratos estudiados, evidenciada en el descenso de pH, se puede atribuir a la producción de ácidos orgánicos por los microorganismos del kefir. Previamente, se ha descrito la producción de ácido láctico y acético en leche, suero y permeado de suero fermentados con gránulos de kefir de leche (Garrote y col., 2001; Londero y col., 2014; Gamba y col., 2016). La producción de ácidos, como el láctico, por gránulos de kefir de agua no fue determinada en esta investigación pero ha sido reportada por

otros investigadores: el ácido láctico, responsable del sabor agrio y fresco del kefir de agua, fue el principal metabolito de las especies bacterianas, cuya concentración aumentó de $0,7 \pm 0,1$ g/litro a $4,9 \pm 0,2$ g/litro, aunque también se produjeron cantidades más pequeñas de etanol, acetato (cuya concentración aumentó de $0,1 \pm 0,0$ g/litro a $1,0 \pm 0,1$ g/litro) y manitol (Laureys y De Vuyst., 2014). Estos resultados, a su vez, son comparables con los que presenta Franzetti y col. (1998) para productos fermentados obtenidos con cinco gránulos de kefir de agua de distintos orígenes. Obtiene un contenido de ácido láctico entre 0,9 y 54,9 mg/100ml. Además, según los resultados obtenidos por Iraporda(2010), el contenido de ácido láctico varía entre 7,0 y 14,0 mg/100 ml y el de ácido acético entre 5,0 y 26,0 mg/100 ml. Finalmente, Teixeira y col. (2010) evaluaron los ácidos orgánicos (láctico y acético) en una bebida hecha con azúcar morena (5% p/v) fermentada con gránulos de kefir de agua (11% p/v) por un periodo de 24 horas a temperatura ambiente (25 °C), encontrando cantidades de 19,42 mmol/L de ácido láctico (aproximadamente) y 23,31 mmol/L de ácido acético. A su vez, Magalhães y col. (2010) señalaron que, al final de una fermentación de 24 horas, se obtuvo una concentración de ácido láctico, ácido acético y de etanol de 1,8 mg/ml, 1,4 mg/ml y 1,24 mg/ml, respectivamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta esta instancia, se seleccionó el **sustrato AB1** (solución de azúcar blanca con pasas de uva al 5% p/v) para la obtención del producto fermentado que se adicionará al pan dulce por tener la mayor capacidad de acidificación del gránulo, y el **sustrato M** (solución de azúcar de mascabo) para mantener el gránulo activo, ya que con él se obtuvo el mayor aumento de biomasa.

4.1.3 Recuento de grupos microbianos en los sustratos seleccionados

Teniendo en cuenta los sustratos elegidos anteriormente para la obtención del producto fermentado (AB1) y conservación del gránulo (M), se hicieron recuentos de los grupos microbianos LEV, BAL y BAA presentes en ellos, a diferentes tiempos de incubación: 24, 48 y 72 horas. Los resultados se muestran en la siguiente tabla (Tabla 6):

Tabla 6. Recuentos de levaduras (LEV), bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA) presentes en los sustratos M y AB1 fermentados con gránulos de kefir de agua CMUNLP1 a distintos tiempos de incubación*.

Sustrato	M			AB1		
	24	48	72	24	48	72
Levaduras	6,55 ± 0,07 E+05	9,25 ± 3,89 E+05	2,81 ± 0,22 E+06 ^a	1,20 ± 0,56 E+05	3,50 ± 2,83 E+05	1,44 ± 0,09 E+06 ^b
Bacterias Ácido Lácticas	3,50 ± 0,70 E+05	5,95 ± 4,74 E+06	2,18 ± 0,31 E+07 ^a	1,50 ± 0,01 E+06	1,66 ± 0,91 E+07	2,75 ± 0,33 E+07 ^a
Bacterias Ácido Acéticas	6,65 ± 0,63 E+05	3,75 ± 1,77 E+07	2,00 ± 0,14 E+07 ^a	2,00 ± 0,02 E+05	2,51 ± 0,07 E+07	2,60 ± 0,33 E+07 ^a

* Los sustratos fueron fermentados con gránulos de kefir de agua CMUNLP1 inoculados al 10 % p/v, durante 72 horas a 25 °C. Los recuentos fueron realizados a las horas 24, 48 y 72. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los sustratos evaluados ($p < 0,05$).

Los datos que se observan en la tabla 6 indican que cada uno de los grupos microbianos, en ambos sustratos, sigue el mismo comportamiento: su concentración va en aumento desde las 24 a las 72 horas. Las BAL y BAA se mantienen un orden por encima de las LEV, como es de esperar en la comunidad microbiana del kefir. El Código Alimentario Argentino, en el Capítulo VIII, Alimentos Lácteos, Artículo 576, establece el recuento de microorganismos para el kefir de leche con 1,00 E+07 y 1,00 E+04 UFC/ml para BAL y LEV, respectivamente. Sin embargo, no se establecen los requisitos para el kefir de agua ya que no se encuentra incluido aún en el código. Por lo tanto, se decidió comparar los recuentos obtenidos en los productos fermentados con los valores requeridos para el kefir de leche (CAA, 2019). Los recuentos de BAL se correspondieron a los requeridos a partir de las 48 y 72 horas en los sustratos AB1 y M, respectivamente. Los recuentos de LEV, a diferencia de los de BAL, fueron superiores a los mínimos establecidos por el CAA desde la hora 24 de incubación. Adicionalmente, si bien a las 48 horas en AB1 ya se alcanzaba un recuento de los microorganismos del kefir acorde a lo establecido por el CAA, y un valor ácido de pH (inferior a 4), a mayores tiempos de incubación se alcanzaron mayores concentraciones de los grupos microbianos. Cabe aclarar que se hicieron los recuentos de BAA en el producto fermentado, aunque no están reguladas por la legislación.

Iraporda (2010) también evaluó los recuentos en sustrato de agua azucarada con el agregado de higos secos y limón, y sus resultados fueron similares a los obtenidos en este trabajo a la hora 24. Adicionalmente, Sirakou y col. (2019) analizaron los recuentos de LEV y BAL en gránulos de kefir que fueron empleados en la fermentación de soluciones de azúcar morena, determinando un valor de 1,00 E+04 UFC/g y 1,00 E+06

UFC/g de BAL y LEV, respectivamente. En nuestro estudio, los órdenes determinados en el producto fermentado son inversos, siendo mayores para las BAL (1,00 E+07 UFC/ml) que para las LEV (1,00 E+06 UFC/ml). Esto pudo deberse a que los gránulos que se emplearon en este trabajo son gránulos de kefir de agua, siempre conservados y subcultivados en sustratos de azúcar de mascabo. Por el contrario, la investigación citada empleó gránulos de kefir de leche que fueron adaptados a un sustrato dulce, lo cual pudo haber afectado a algunas de las BAL que componen el gránulo de kefir ya que son microorganismos que se caracterizan, en general, por ser muy exigentes a nivel nutricional.

4.2 Elaboración del pan dulce

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se seleccionó el producto fermentado con el sustrato AB1 para agregar al pan dulce, en lugar del agua de la fórmula, a fin de evaluar su efecto sobre la vida útil del mismo. Este pan se denominó K y el pan control adicionado con agua se denominó C.

Para obtener el producto fermentado a pH 3,2 (pH mínimo alcanzado en los ensayos anteriores) se hicieron fermentaciones en el sustrato AB1 inoculado al 10% p/v con los gránulos de kefir de agua CMUNLP1. Los tiempos de fermentación necesarios para alcanzar dicho pH, en esta etapa del estudio, fueron de 72 horas.

A su vez, al momento de la elaboración de los panes, se hicieron recuentos de LEV, BAL y BAA en el producto fermentado a emplear y en el glasé, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 7):

Tabla 7. Determinación de levaduras (LEV), bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA) en el producto fermentado elaborado con sustrato AB1 a emplear en el pan dulce y en el glasé^{*,**}.

MICROORGANISMOS	Producto Fermentado (UFC/ml)	Glasé (UFC/ml)
Levaduras	3,10 ± 0,10 E+06	6,40 ± 0,10 E+05
Bacterias Ácido Lácticas	2,60 ± 0,10 E+07	6,90 ± 0,60 E+06
Bacterias Ácido Acéticas	3,10 ± 0,30 E+07	1,70 ± 0,30 E+06

* El sustrato AB1 fue fermentado con gránulos de kefir de agua CMUNLP1 inoculados al 10 % p/v, durante 72 horas a 25°C, hasta pH final de 3,2. El recuento se realizó al alcanzar el pH final. **El glasé se elaboró con el producto fermentado (una vez alcanzado el pH final) y azúcar impalpable, e inmediatamente se realizó el recuento.

Los recuentos obtenidos en el producto fermentado coinciden con los determinados en los análisis anteriores a 72 horas. Es importante aclarar que, a diferencia de los resultados mostrados en el **inciso 4.1.2**, se requirió más de 24 horas de incubación para alcanzar un pH de 3,2. Esto podría atribuirse a que, en esta etapa de la investigación, las fermentaciones se hacían activando el gránulo conservado en refrigeración, con una fermentación previa de 24 horas; y luego, se hacía una segunda fermentación para obtener el producto fermentado, requiriéndose 72 horas para alcanzar el pH deseado.

El glasé se elaboró con 80 gramos de producto fermentado en 120 gramos de azúcar impalpable, lo cual equivale a una dilución de 2,5 veces la concentración inicial de microorganismos. De acuerdo a los cálculos teóricos, los recuentos estarían alrededor de $1,24 \text{ E}+06$, $1,04 \text{ E}+07$ y $1,26 \text{ E}+07$ UFC/ml para LEV, BAL y BAA, respectivamente. No obstante, los recuentos reales obtenidos en el producto fueron menores a los calculados, en especial las BAA. Esto pudo deberse a que las bacterias y las levaduras son más sensibles a la alta concentración de azúcares, reduciéndose su recuento una vez preparado el glasé.

4.3 Determinación de la resistencia a la contaminación fúngica del pan dulce adicionado con producto fermentado

4.3.1 Determinación de la resistencia a la contaminación natural

Para valorar la contaminación natural, se hizo recuento de los grupos microbianos del kefir y de hongos filamentosos en los panes K y C, a los 0, 4 y 7 días de su elaboración, almacenados en estufa a 25 °C. Los resultados pueden apreciarse en la siguiente tabla (Tabla 8):

Tabla 8. Determinación de LEV, BAL y BAA del kefir y de hongos filamentosos en pan dulce elaborado con producto fermentado (K) y en pan dulce control (C)*.

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	Día 0		Día 4		Día 7	
	Pan Dulce C	Pan Dulce K	Pan Dulce C	Pan Dulce K	Pan Dulce C	Pan Dulce K
Hongos filamentosos	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Levaduras	<100	5,60 ± 1,10 E+04	<100	1,40 ± 0,30 E+03	<100	7,50 ± 0,70 E+02
Bacterias Ácido Lácticas	<100	9,70 ± 1,00 E+04	<100	<100	<100	<100
Bacterias Ácido Acéticas	<100	1,00 ± 0,60 E+05	<100	5,20 ± 0,40 E+03	<100	<100

*Los recuentos se realizaron a los días 0, 4 y 7 de la elaboración del pan dulce, almacenado a 25°C. Los recuentos de LEV, BAL, BAA y hongos filamentosos se hicieron en los medios de cultivo YGC, MRS, AAB y DRBC, respectivamente.

Los resultados mostrados en la tabla 8 permiten observar que los recuentos en pan dulce C fueron menores a 100 UFC/g para hongos filamentosos, LEV, BAL y BAA en todos los tiempos evaluados. Por el contrario, en el pan dulce K, se evidenció la presencia de estos grupos microbianos, aunque no de hongos filamentosos. Estos microorganismos, posiblemente, provienen del glasé que recubre el pan dulce ya que aquellos incorporados junto al producto fermentado en la fórmula mueren durante el horneado. No obstante, el producto fermentado aporta ácidos orgánicos termorresistentes que, al igual que los microorganismos presentes en el glasé, persisten en el pan y pueden aportar a una mayor vida útil.

A lo largo de los días de análisis, el recuento de dichos microorganismos disminuye. Las BAL aparecen en el día 0 de análisis, es decir, en el pan dulce recién elaborado, pero en los días 4 y 7 se obtiene un recuento menor a 100 UFC/g, interpretándose que disminuyeron drásticamente. Las BAA, por su parte, aparecen en un orden superior al resto al día 0; mientras que al día 4 disminuyen en dos órdenes de magnitud y al día 7 se encuentran también por debajo de 100 UFC/g. Las LEV, en cambio, son el grupo más resistente al almacenamiento, ya que su concentración va disminuyendo paulatinamente y aún al día 7 siguen estando presentes, aunque en dos órdenes de magnitud menos que al comienzo. En concordancia con estos resultados, Moure (2013) obtuvo, en el día 1 de ensayo, un recuento de levaduras y bacterias ácido lácticas en el pan rociado de $2,10 \text{ E}+05 \text{ UFC/g}$ y $2,80 \text{ E}+04 \text{ UFC/g}$, respectivamente. Sin embargo, la concentración de las BAL disminuyó rápidamente a los pocos días mientras que la de las levaduras aumentó. Este aumento pudo deberse al crecimiento de las levaduras propias del kefir incorporadas al rociar el pan y/o al crecimiento de levaduras contaminantes provenientes del ambiente.

Por lo tanto, pudo observarse que, luego de una semana de elaborado, ambos panes siguen siendo aceptables microbiológicamente ya que no se ha detectado presencia de contaminación fúngica. Esto quiere decir que a nivel de la contaminación fúngica natural evaluada para 7 días de almacenamiento no existe diferencia aportada por la adición del producto fermentado en la fórmula y en el glase. No obstante, el pan dulce K, presenta un recuento de BAA y levaduras hasta el día 4, y de levaduras hasta el día 7; y si bien en este trabajo no se ha estudiado el carácter probiótico de los microorganismos del gránulo de kefir de agua CMUNLP1, sí se han reportado estas propiedades en otros estudios similares. Según Galdeano y Perdigon (2006), algunas cepas de *L. casei* muestran potencial probiótico, lo que hace que el ecosistema de kefir de agua sea una posible fuente de nuevas cepas probióticas *L. casei*. Asimismo, Liu y col. (2005), Rosa y col. (2017) y Zamberi y col. (2016) afirman que el kefir y sus microorganismos tienen una variedad de efectos terapéuticos, que incluyen actividades antitumorales, antimicrobianas, antioxidantes, antimutagénicas e hipocolesterolémicas. Así también, Alwan y col. (2014) y Chen y col. (2014) evidenciaron que los alimentos que contienen bacterias ácido lácticas (BAL) tienen efectos beneficiosos para la salud.

En caso de que en estudios posteriores se demuestre que los microorganismos de este gránulo poseen dichas propiedades, su supervivencia en el pan sería un aporte a la alimentación saludable de los consumidores. Además, podría determinarse la presencia y concentración de algunos ácidos orgánicos, los cuales podrían aportar a la conservación del mismo, evaluada por períodos de tiempo superiores a los estudiados en esta investigación.

4.3.2 Determinación de la resistencia a la contaminación artificial

La resistencia del pan dulce a la contaminación artificial se definió como los días necesarios para la aparición visible del hongo filamentoso sobre la superficie del pan dulce; momento en el cual se procedió a corroborar la presencia de los hongos inoculados y a determinar las poblaciones de microorganismos viables en el mismo.

Los resultados obtenidos se presentan en las siguientes tablas (Tabla 9 y 10).

Tabla 9. Resistencia a la contaminación artificial de pan dulce elaborado con producto fermentado (K) y pan dulce control (C), cuantificada en días *, **, ***.

Hongo	Tratamiento	Días promedio de aparición del hongo
<i>Aspergillus niger</i> (P1)	C	8,6 ± 0,5 ^a
	K	30,0 ± 0,0 ^b
<i>Penicillium sp.</i> (P2)	C	15,3 ± 0,5 ^a
	K	26,0 ± 1,7 ^b
<i>Rhizopus sp.</i> (P3)	C	13,6 ± 1,1 ^a
	K	26,3 ± 2,1 ^b

*La resistencia del pan se definió como los días necesarios para hacerse visible el crecimiento fúngico. Se entiende como día 0 aquel en que se inoculó el hongo artificialmente sobre el pan. **Los panes se inocularon con 1,00 E+04 conidios/100 gramos de pan. ***Resultados promedio de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

Los resultados presentados en la tabla anterior se pueden observar gráficamente en la figura 19:

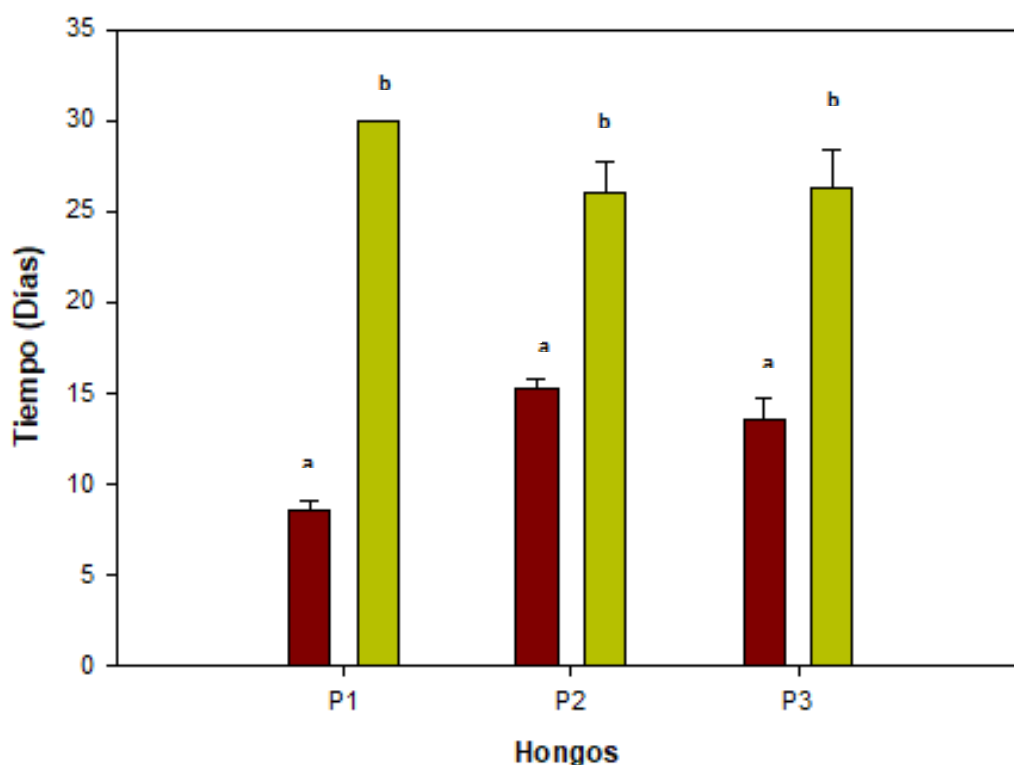


Figura 19. Resistencia a la contaminación artificial de pan dulce elaborado con producto fermentado (K) y pan dulce control (C), cuantificada en días *, **, ***. ■: Pan C contaminado. ■: Pan K contaminado. **P1:** *Aspergillus Niger*; **P2:** *Penicillium sp.*; **P3:** *Rhizopus sp.* * La resistencia del pan se determinó como los días necesarios para hacerse visible el crecimiento fúngico. Se entiende como día 0 aquel en que se inoculó el hongo artificialmente sobre el pan. ** Los panes se inocularon con 1,00 E+04 conidios/100 gramos de pan. ***Resultados promedio de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

Los valores presentados en la tabla 9 demuestran que, independientemente del hongo con el que se haya realizado la contaminación, el pan dulce K presentó una resistencia a la contaminación artificial significativamente superior ($p < 0,05$) a la presentada por el pan dulce C.

Si consideramos los tratamientos independientemente, puede verse que hubo un comportamiento similar en la resistencia a la contaminación. Los panes C comenzaron a mostrar el crecimiento fúngico en superficie entre los 8 y los 15 días de almacenamiento, mientras que los panes K comenzaron a mostrarlo a partir del día 26. Es decir, en los panes K, la aparición visible del hongo tuvo lugar mínimamente 10 días después de la ocurrida en los panes C. Recientemente, Luz y col. (2020) publicaron un estudio sobre la elaboración de pan

de pita, donde toda el agua de la fórmula se reemplazó con el sobrenadante obtenido de suero de leche de cabra fermentado con cepas de *L. plantarum*. El pan se contaminó artificialmente con *Penicillium brevicompactum* y *P. expansum*, determinando la aparición visible de los hongos a los 9 días de almacenamiento en los tratamientos, mientras que en los panes control, ésta tuvo lugar desde el día 2 de almacenamiento. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por estos investigadores en cuanto al aumento en la resistencia a la contaminación artificial otorgada por la presencia del producto fermentado en la fórmula. Sin embargo, en nuestros panes los tiempos registrados fueron mayores. Esto pudo deberse, en parte, a que en la investigación citada, la contaminación se hizo con una concentración mayor de conidios ($2,5 \times 10^7$ con/100 g pan). Posiblemente, este resultado mejorado también responda a una mayor variedad de metabolitos antifúngicos en el kefir de agua, en virtud de la complejidad de la comunidad microbiana del gránulo, constituido por especies de LEV, BAL y BAA; lo cual deberá ser estudiado en un futuro para los gránulos empleados.

Según Cheftel y col. (1980) hay que tener en cuenta que durante la cocción del pan dulce la temperatura interna del mismo no sobrepasa los 100°C y que la corteza, aunque sí lo hace, tiene un menor contenido de agua. Además, dado que los puntos de ebullición para el ácido láctico y el ácido acético son 98°C y 118°C, respectivamente, podría pensarse que parte de estos ácidos permanecen en la masa aún después del tratamiento térmico en el caso del pan K, generando una mayor resistencia a la contaminación artificial respecto al pan dulce C, el cual no contaría con la presencia de los mismos. A su vez, si bien es más factible que en la corteza estos ácidos se evaporen más que en el interior de la miga, sabemos que la misma cuenta con el glasé que le fue agregado por encima, una vez horneados. Éste provee a los panes, además de los ácidos orgánicos ya mencionados, microorganismos viables que pueden contribuir a la resistencia contra la contaminación fúngica.

Este hecho también se ve reflejado si observamos que el pH del pan K es más ácido que el del pan C (4,8 y 5,4 respectivamente) y a su vez, tiene mayor acidez (0,315 y 0,135 gr ac. láctico/ 100 g muestra, respectivamente) (tabla 11 – **inciso 4.4**) debido, posiblemente, a la presencia de los ácidos orgánicos ya mencionados anteriormente. Estos ácidos han sido identificados por Gerez y col. (2009) mediante técnicas de HPLC en panes y otros productos derivados de cereales elaborados con bacterias ácido lácticas y han sido considerados responsables de la resistencia ante la contaminación fúngica. En coincidencia con estos resultados, en el grupo de investigación donde se hizo este trabajo se determinó la resistencia conferida por la adición del kefir de leche a alimentos para aves. La adición de kefir de leche a pH 3,5 a la “arepa antioqueña” aumentó su resistencia frente a la contaminación artificial con *A. flavus* AFUNL5. Además, se comparó la resistencia obtenida con este producto y con leche acidificada artificialmente con ácidos láctico y acético y con HCl. Se pudo determinar que la leche acidificada artificialmente no confería la misma

resistencia que el kefir, por lo cual se pudo concluir que la inhibición fúngica impartida por la leche fermentada por kefir fue causada por la acción combinada de los ácidos orgánicos y por otros metabolitos producidos por los microorganismos del kefir que debían ser investigados (Gamba y col., 2016b). Asimismo, Gamba y col (2016c) adicionaron permeado de suero fermentado con gránulos de kefir de leche en pan y alimento para aves y pudieron establecer que estos productos eran más resistentes a la contaminación artificial con *A. flavus* AFUNL5, *A. parasiticus* NRRL 2999 y *P. sumatrense* CMUNLP3. Se pudo determinar la presencia de ácido láctico y acético proveniente del kefir en ambos alimentos, atribuyendo a éstos el aumento en la resistencia a la contaminación artificial. Para comprobarlo, en un estudio futuro, se podría determinar su contenido en la masa del pan dulce cocido.

Previamente, Magnusson y col. (2003) han reportado que en estos productos se encuentran metabolitos tales como ácidos orgánicos, reuterina, peróxido de hidrógeno, péptidos, compuestos fenólicos y ácidos grasos hidroxilados. A su vez, Lavermicocca y col. (2000) han identificado algunos de estos compuestos con actividad antifúngica producidos por *L. plantarum*, tales como ácido feniláctico y ácido 4-hidroxifeniláctico, aislados de masa ácida. Dal Bello y col. (2007) mostraron que la adición de masa madre, fermentada por *L. plantarum* FST 1.7 o *L. sanfranciscensis* LTH 2581, provocó un cambio notable en las propiedades de la masa y, a su vez, una mejora en la vida útil de los panes. La producción de ácido láctico, ácido feniláctico y dos dipéptidos cíclicos (L-Leu-L-Pro y L-Phe-L-Pro) en los medios de cultivo y la masa madre se relacionaron directamente con la actividad antifúngica (Ryan y col. 2009a, 2009b). La calidad del pan de trigo mejora con la adición de masa madre en los ensayos realizados por Barber y col. (1992); Hammes y Ganzle (1997). Los productos metabólicos de las levaduras y BAL mejoran las propiedades de la harina, así como el aroma, el sabor, el valor nutritivo y la vida útil del pan (Clarke y Arendt, 2005). En su experimento, Luz y col. (2019) mostraron el alto potencial de la cepa *L. plantarum* para mejorar la vida útil del pan contaminado por *Bacillus subtilis* y *Mucor sp.*

Adicionalmente y en concordancia con lo determinado por Moure (2013), hubo diferencias entre el tratamiento y el control cuando se evaluó la contaminación artificial, pero no sucedió lo mismo cuando se estudió la contaminación natural. En la primera, el resultado es más homogéneo dentro de cada tratamiento debido posiblemente a que se da una contaminación controlada con un igual recuento de conidios. Por el contrario, en la contaminación natural hay mayor variabilidad en la contaminación de cada producto por las esporas del ambiente, dependiendo de cómo y dónde se depositan en cada pan.

Una vez tuvo lugar la aparición visible de los hongos, se determinaron los recuentos de LEV, BAL Y BAA en los panes C y K, los cuales se presentan en la siguiente tabla (Tabla 10):

Tabla 10. Determinación de los recuentos de LEV, BAL Y BAA en el pan dulce elaborado con producto fermentado (K) y en el pan dulce control (C)*.

Hongo	Pan No.	Pan dulce C			Pan dulce K		
		LEV	BAL	BAA	LEV	BAL	BAA
<i>Aspergillus niger</i> (P1)	1	<100	<100	<100	3,33 ± 0,12 E+03	<100	<100
	2	<100	<100	<100	4,35 ± 0,21 E+03	<100	<100
	3	<100	<100	<100	<100	<100	<100
<i>Penicillium</i> sp. (P2)	1	1,47 ± 0,32 E+05	<100	<100	<100	<100	<100
	2	9,80 ± 0,07 E+03	<100	<100	<100	<100	<100
	3	3,80 ± 1,80 E+03	<100	<100	<100	<100	<100
<i>Rhizopus</i> sp. (P3)	1	2,51 ± 0,32 E+04	<100	<100	2,00 ± 0,01 E+02	<100	<100
	2	1,75 ± 0,21 E+04	<100	<100	3,10 ± 0,20 E+03	<100	<100
	3	<100	<<100	<100	8,00 ± 2,80 E+02	<100	<100

*Los recuentos se informan como UFC/g de pan.

Con los recuentos obtenidos en este análisis (Tabla 10), podemos observar, en primera instancia, que para el pan dulce C y el pan dulce K, los recuentos de BAL y BAA son <100 UFC/g en todos los tratamientos aplicados. Es decir, podría pensarse que la resistencia de las mismas a lo largo del tiempo, va disminuyendo; resultado que coincide con los ensayos de contaminación natural (**inciso 4.3.1**) donde, luego de una semana de almacenamiento, ambos grupos microbianos ya se encontraban por debajo de 100 UFC/g. Respecto a las levaduras, podemos ver que las mismas se encuentran viables en órdenes de 1,00 E+02 a 1,00 E+03 para el pan K y de 1,00 E+03 hasta 1,00 E+05 para el pan C, para los tratamientos con *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp., respectivamente, aún cuando ya era visible la aparición del hongo filamentoso. Esto indica, por un lado, la resistencia de las mismas en función del tiempo (resultado también observado en la contaminación natural) aunque debemos tener en cuenta que no es posible aseverar el origen de las levaduras contadas; en el pan dulce K podría pensarse que las mismas son aportadas por el producto fermentado pero, en el pan dulce C, su origen es incierto.

Finalmente, para cada pan analizado se determinó el crecimiento del hongo en medios de cultivo DRBC. Se hicieron los aislamientos y observaciones a nivel microscópico para tener un primer acercamiento a su morfología. No obstante, estos hongos fueron preservados en refrigeración en agar agua estéril (**ver Anexo 1**) para ser identificados a nivel morfológico y molecular en un siguiente estudio, a fin de corroborar que fueron los hongos empleados para contaminar artificialmente el pan.

4.4 Análisis físico – químico del pan dulce adicionado con producto fermentado

Se realizó el análisis físico-químico del pan dulce elaborado con producto fermentado (K). A su vez, para poder tener un parámetro de comparación, se realizó el mismo análisis en un pan dulce control (C), es decir, aquel elaborado con la receta original sin el agregado de producto fermentado.

Para ello, se llevaron a cabo las siguientes determinaciones: proteínas totales por el método de Kjeldahl, materia grasa por el método de Soxhlet, glúcidos totales por diferencia respecto de los demás componentes de la muestra, humedad por método indirecto y cenizas totales por calcinación en mufla. Adicionalmente, se midió el volumen específico del pan dulce, junto a la acidez titulable por valoración con NaOH 0,1 N, y el pH. Los resultados se expresan en la tabla 11.

Tabla 11. Composición físico-química del pan dulce elaborado con producto fermentado (K) y con agua (C)*.

**.

Pan Dulce		
Análisis	Pan Dulce C	Pan Dulce K
Calorias (Kcal/100 g)	381 ± 1 ^a	391 ± 13 ^a
Hidratos de Carbono (g/100 g)	64 ± 1 ^a	64 ± 1 ^a
Proteínas (g/100 g)	6,5 ± 1,5 ^a	6,4 ± 0,6 ^a
Grasas (g/100 g)	6,9 ± 0,3 ^a	8,1 ± 0,9 ^a
Cenizas (%)	0,80 ± 0,01 ^a	0,84 ± 0,16 ^a
Humedad (%)	22 ± 0 ^a	20 ± 2 ^a
Volumen Específico (cm ³ /g)	1,1 ± 0,1 ^a	1,2 ± 0,0 ^a
Acidez (g ácido láctico/100 g de muestra)	0,1 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,0 ^b
pH	5,4 ± 0,0 ^a	4,9 ± 0,0 ^b

*La porción equivale a 100 g de producto. **Los decimales se ajustan según el capítulo V, artículo 3.4.3 del Código Alimentario Argentino (CAA, 2017). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros fisicoquímicos evaluados ($p < 0,05$).

Los resultados presentados en la tabla 11 y el análisis estadístico de los mismos, permiten afirmar que no existen diferencias significativas entre los valores de los parámetros analizados del pan dulce K y C, a excepción de la acidez y el pH. Se puede observar un leve aumento en las calorías en el pan dulce K, lo cual puede relacionarse con la presencia de azúcares que quedan en el kefir de agua (Caro, 2012) y con el leve aumento descrito para las grasas. Asimismo, notamos un pH menor en el pan dulce K que en el C, lo que se corresponde con la determinación de acidez titulable, la cual es mayor para el pan dulce K que para el C. Estos valores pueden relacionarse con la presencia de ácidos orgánicos (tales como ácido láctico y acético) en el producto fermentado (Caro y León, 2014-2015), propios de dicha fermentación, y que pasan al pan dulce cuando el mismo es incorporado en la fórmula. Respecto al volumen específico, el pan K presenta un valor mayor, pero sin diferencias significativas respecto al pan C, lo cual puede deberse al proceso de amasado. Finalmente, si nos detenemos en las exigencias impuestas en el art. 744 del Código Alimentario Argentino para pan dulce (CAA, 2019): “Deberá responder a las siguientes exigencias: Humedad, Máx.: 30 g por 100 g”, podemos aseverar que nos encontramos dentro del valor exigido por la legislación.

4.5. Análisis sensorial del pan dulce elaborado con producto fermentado

Se realizó una prueba de aceptabilidad sensorial consistente en comparar el pan dulce K y C. Se presentó a cada uno de los 122 panelistas una porción de cada pan al azar y se les pidió que a cada una de ellas le asignaran un puntaje del 1 al 10, siendo 1 “no me gusta nada” y 10 “me gusta muchísimo”. Además, debían marcar si comprarían el producto o no, y podían adicionar un comentario.

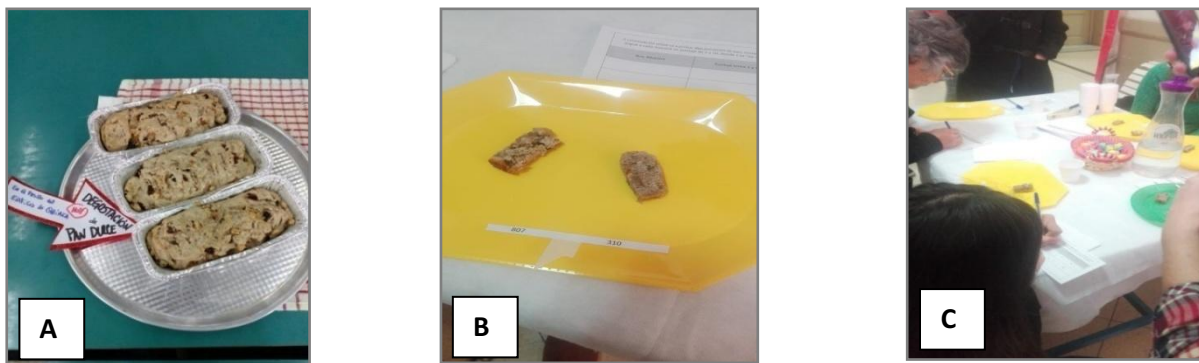


Figura 20. Imágenes de la prueba de aceptabilidad sensorial. **A)** Pan dulce recién horneado, listo para preparar las muestras para el ensayo. **B)** Porciones de ambos pan dulce según como se presentaban a los panelistas. **C)** Momento de la evaluación, donde cada panelista respondía la encuesta.

La distribución del puntaje asignado en función del porcentaje de población se analizó mediante un histograma y se presenta en la figura 21.

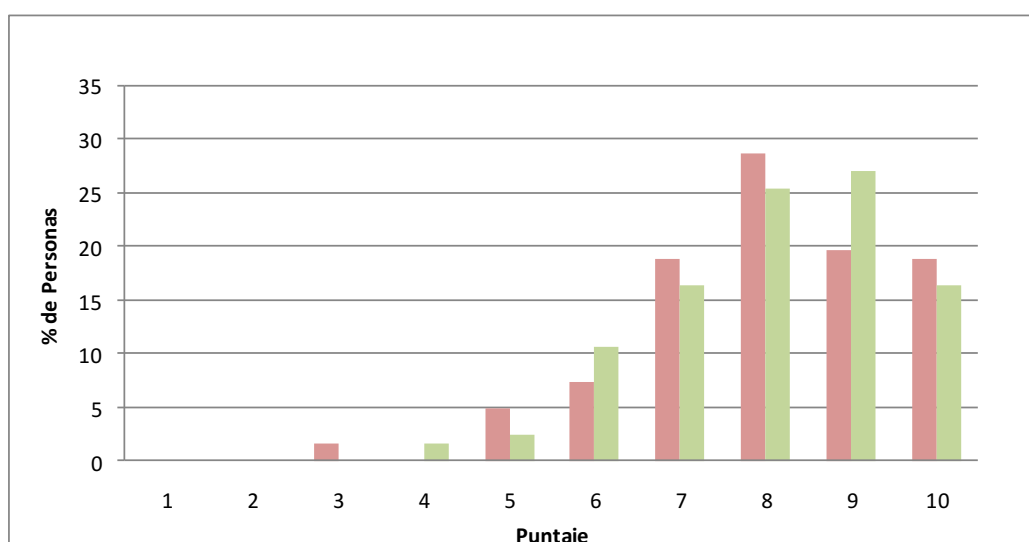


Figura 21. Resultados de la prueba de aceptabilidad sensorial según escala hedónica para el pan dulce elaborado con producto fermentado (K) y con agua (C). ■: % de asignación de puntaje al pan dulce K. ■: % de asignación de puntaje al pan dulce C.

El histograma obtenido permite observar que las notas asignadas fueron ascendiendo hasta valores entre 8 y 9 junto con el porcentaje de evaluadores que las asignaban y luego, descendieron hacia el valor 10. Los valores mínimos fueron asignados por sólo un 2% de los evaluadores (3 y 4 para K y C, respectivamente).

Los valores fueron ascendiendo y superaron el puntaje medio de 5 (ni gusta ni disgusta). Entre los puntajes asignados, en 8 y 9 se concentró el mayor porcentaje de los evaluadores (entre el 19 y 28%), por ende, en este rango se determinó el puntaje promedio para ambos panes, los cuales se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Aceptabilidad global promedio de los panes y porcentaje de consumidores que lo comprarían.

Pan Dulce	Puntaje	Porcentaje de consumidores que lo comprarían
K	8,00 ± 1,52 ^a	85,25
C	8,07 ± 1,42 ^a	86,06

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre el pan dulce K y C ($p < 0,05$).

En función de los datos de la tabla 12 y de acuerdo a la escala hedónica utilizada, observamos que el puntaje obtenido, en ambos casos, se correspondió a “me gusta mucho”, lo que refiere a una buena aceptación general, sin diferencias significativas del pan elaborado con producto fermentado respecto al control. Además, el porcentaje de personas que lo comprarían fue elevado: mayor al 80% para todos los casos.

Sin embargo, sería complementaria a este estudio una *prueba de discriminación* con el fin de detectar diferencias a nivel sensorial entre los tratamientos; como así también, un análisis de mercado en función del precio y comercialización del mismo.

5. CONCLUSIONES

A partir del conjunto de resultados obtenidos durante esta investigación, pudo demostrarse que los gránulos de kefir de agua constituyen un sistema microbiológico donde conviven en simbiosis bacterias y levaduras; además de que presentan una capacidad fermentativa y de acidificación que se encuentra afectada por los sustratos empleados, como así también por las fuentes adicionales de nutrientes que puedan llegar a tener los mismos. Particularmente en esta investigación se pudo determinar que, de todos los sustratos evaluados, aquel en el cual se obtuvo mayor incremento de biomasa fue el elaborado con la solución de azúcar de mascabo (sustrato M), por lo que se seleccionó para mantener el gránulo activo. Adicionalmente, el sustrato que alcanzó menor pH, que fue seleccionado para la obtención del producto fermentado que se adiciona al pan dulce, fue el elaborado con la solución de azúcar blanca con pasas de uva al 5% p/v (sustrato AB1). De esta manera, se logra obtener un producto fermentado que contiene no solo microorganismos, sino también ácidos orgánicos.

A su vez, se pudo concluir que, con estos sustratos, los recuentos de levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas a las 72 horas, se mantuvieron en un orden de $1,00 \text{ E}+06 \text{ UFC/g}$, $1,00 \text{ E}+07 \text{ UFC/g}$ y $1,00 \text{ E}+07 \text{ UFC/g}$, respectivamente.

En cuanto a la adición de estos productos fermentados en un producto de panificación a fin de evaluar su efecto sobre la vida útil, los ensayos antes realizados sobre contaminación natural nos permitieron observar que luego de una semana de elaborados, los panes control (sin adición de producto fermentado) y aquellos adicionados de producto fermentado, siguen siendo aceptables microbiológicamente y, a su vez, presentan resistencia a la contaminación fúngica. Esto significa que, dentro de la primera semana de almacenamiento, no existe diferencia entre el control y el tratamiento aportada por la adición del producto fermentado en la fórmula y en el glaseado. No obstante, en el pan dulce adicionado con producto fermentado se observó la presencia de levaduras y bacterias ácido acéticas que, aunque no se haya estudiado en este trabajo, podría aportar propiedades funcionales y de carácter probiótico al producto final.

En lo referente al estudio de contaminación artificial, se pudo demostrar que, independientemente del hongo con el que se haya realizado la contaminación, el pan dulce adicionado con producto fermentado presentó una resistencia significativamente superior ($p < 0,05$) a la presentada por el pan dulce control (sin adición de producto fermentado). Es decir, en los panes dulces adicionados con producto fermentado, la aparición visible del hongo tuvo lugar mínimamente 10 días después de la ocurrida en los panes control. En este caso, también se pudo apreciar un recuento de levaduras hacia el fin del periodo de análisis; lo que

permite inferir que la adición del producto fermentado constituiría una ventaja en la conservación del pan dulce.

En función de los ensayos fisicoquímicos realizados, pudimos establecer que el pan dulce adicionado con el producto fermentado no presenta variaciones significativas respecto a un pan dulce control; a excepción del menor pH y la acidez final superior, que pueden ser atribuidos a la presencia de los ácidos orgánicos propios de dicha fermentación, que pasan al pan dulce cuando el mismo es incorporado en la fórmula. A su vez, los valores de humedad determinados para el pan dulce control y con producto fermentado estuvieron dentro del valor exigido por el CAA para el valor de humedad máxima aceptable.

Finalmente, el puntaje obtenido en el análisis sensorial, que se corresponde en ambos casos a “me gusta mucho”, refiere a una buena aceptación general, sin diferencias significativas entre el pan dulce control y con producto fermentado. Además, el porcentaje de personas que lo comprarían es elevado, mayor al 80% para todos los casos, lo que permite pensar en una buena aceptación en el mercado.

Una recomendación apreciable sería que se continúen los estudios sobre la aplicación de este producto fermentado para poder convertir el pan dulce en un producto comercializable para las emprendedoras que conforman la Asociación Civil “El Refugio” del barrio Puente de Fierro.

6. PERSPECTIVAS

Con el objetivo de conocer en mayor profundidad los temas examinados en este trabajo, sería importante realizar a futuro:

- ✚ Una determinación de las concentraciones totales de azúcares fermentables.
- ✚ Una determinación de los compuestos antifúngicos generados por el kefir, además de la cuantificación de los ácidos láctico y acético. También sería importante estudiar el perfil de ácidos presentes en los pan dulce mediante la técnica HPLC, a fin de evaluar las concentraciones finales en el producto y relacionarlos con la resistencia a la contaminación y con su conservación.
- ✚ Un análisis de fibra, sodio y colesterol para completar el rótulo e inscripción del producto.
- ✚ La identificación a nivel morfológico y molecular de los hongos preservados en refrigeración en agar agua estéril (**Ver Anexo 1**), a fin de corroborar que fueron los hongos empleados para contaminar artificialmente el pan.
- ✚ Un estudio sensorial de los panes en función del tiempo de almacenamiento para determinar si existen cambios en su aceptabilidad dentro de la vida útil del producto.
- ✚ Una prueba de discriminación con el fin de detectar diferencias a nivel sensorial entre los tratamientos.
- ✚ Un estudio del carácter probiótico de los microorganismos del gránulo de kefir de agua CMUNLP1. En caso de que se demuestre que los microorganismos de este gránulo poseen dichas propiedades, su supervivencia en el pan sería un aporte a la alimentación saludable de los consumidores.
- ✚ Un análisis de mercado en función del precio y comercialización del pan dulce.
- ✚ Una capacitación a las productoras del barrio: al finalizar el desarrollo del producto, se realizaría un taller de preparación del producto fermentado con gránulos de kefir de agua y elaboración del pan dulce con la adición del mismo en la unidad productora de alimentos del barrio Puente de Fierro. El encuentro se realizará de manera virtual en primera instancia y, una vez concluya el aislamiento social por la pandemia de COVID 19, presencialmente.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adebayo C, Aderiyé B (2011). Suspected mode of antimycotic action of brevicin SG1 against *Candida albicans* and *Penicillium citrinum*. *Food Control*. 22, 1814–1820.
- Ahmed Z, Wang Y, Ahmad A, Khan ST, Nisa M, Ahmad H, Afreen A (2013). Kefir and health: a contemporary perspective. *CritRev Food Sci Nutr*. 53(5), 422-34. doi: 10.1080/10408398.2010.540360
- Alwan AH, Alsakini AH, Abdurassak FN (2014). The protective effect of probiotics (*Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces boulardii*) against infections caused by *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3, 886–890.
- Axel C, Zannini E, Arendt EK (2017). Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension. *Crirev food sci*. 57(16): 3528-3542.
- Axelsson L (1990). *Lactobacillus reuteri* a member of the gut bacterial flora. Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Aziz NH, Ferial M, Shahin AA, Roushy SM (2007). Control of *Fusarium* moulds and fumonisin B1 in seeds by gamma-irradiation. *Food Control*. 18, 1337–1342.
- Bacteriological Analytical Manual (BAM), Capítulo 18: Hongos, Levaduras y Micotoxinas. U.S. Food and Drug administration. An official website of the United States government. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins> (Último acceso: 09/11/2019).
- Barber B, Ortola C, Barber S, Fernández F (1992). Storage of packaged white bread. III. Effects of sour dough and addition of acids on bread characteristics. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 194, 442–449.
- Batish VK, Roy U, Lal R y Grover S (1997). Antifungal attributes of lactic acid bacteria – A review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 17, 2009–2225.
- Ben Taheur FB, Kouidhi B, Al Qurashi YMA, Salah-Abbès JB, Chaieb K (2019a). Biotechnology of mycotoxins detoxification using microorganisms and enzymes. *Toxicon*. 160, 12–22.
- Ben Taheur FB, Mansour C, Chaieb K (2020). Inhibitory effect of kefir on *Aspergillus* growth and mycotoxin. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration* 5(1):5. DOI: 10.1007/s41207-020-0141-x
- Ben Taheur FB, Mansour C, Kouidhi B, Chaieb K (2019b). Use of lactic acid bacteria for the inhibition of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus carbonarius* growth and mycotoxin production. *Toxicon*. 166, 15–23.
- Bigelis R (1992). Food enzymes. In: D.B. Finkelstein & C. Ball (editors), *Biotechnology of Filamentous Fungi. Technology and Products*. Butter worth Heinemann, Boston, MS, 361-415.

- Calaveras, J. (1996) Tratado de panificación y Bollería. Madrid Vicente Editores, Madrid. ISBN 84-7114561-8. 469 p
- Caro A (2012). Estudio de la inhibición del crecimiento del hongo toxigénico, *Aspergillus ochraceus* con la aplicación de ácidos producidos en un sustrato de panela fermentado con gránulos de kefir de agua. Tesis Maestría Corporación Académica Ambiental. Universidad de Antioquia, Colombia.
- Caro A y León A (2014). Inhibición del crecimiento de *Aspergillus ochraceus* mediante panela fermentada con gránulos de kéfir de agua. VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA 21(3): 223-232.
- Caro A y León A (2015). Capacidad antifúngica de sobrenadantes libres de células obtenidos de la fermentación de un sustrato de “panela” con gránulos de kefir de agua. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 17(2), 22-32.
- Carr JG, Passmore SM (1979). Methods for identifying acetic acid bacteria. In Identification methods for microbiologist. Eds F.A. Shinner & D.W. Lovelock. London Academic Press.
- Cauvain SP, Young LS (2000). Bakery Food Manufacture & Quality: Water Control & Effects, Blackwell Science, Oxford, UK.
- Cheftel JC, Cheftel H, Besançon P (1980). Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos, Vol. II. Editorial Acribia S.A., Zaragoza.
- Chelkowski J (1991). Cereal grain. Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage. Elsevier, Amsterdam.
- Chen P, Zhang Q, Dang H, Liu X, Tian F, Zhao J, Chen Y, Zhang H, Chen W (2014). Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and a-glucosidase inhibitory activity. *Food Control*. 35, 65–72.
- Clarke CI, Arendt EK (2005). A review of the application of sourdough technology to wheat breads. *Advances in Food and Nutrition Research*. 49, 137–161.
- Clarke CI, Schober TJ, Arendt EK (2002). Effect of single strain and traditional mixed strain starter cultures on rheological properties of wheat dough and on bread quality. *Cereal Chemistry*. 79(5), 640.
- Código Alimentario Argentino (CAA), Capítulo IX. Art. 744 - - (Resolución Conjunta SPRyRSN° 31/2003 y SAGPYA N° 286/2003). Administración Nacional de Alimentos. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación, Argentina (2020). http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/marco/CAA/capitulospdf/Capitulo_IX.pdf (Último acceso: 13/11/2020).

- Código Alimentario Argentino (CAA), Capítulo VIII: Alimentos Lácteos. Art. 576 - (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyAN° 33/2006 y N° 563/2006). Administración Nacional de Alimentos. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación, Argentina (2020). https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_viii_lacteosactualiz_2020-01.pdf (Último acceso: 13/11/2020).
- Concejo deliberante de La Plata, 2015 <https://www.concejodeliberante.laplata.gob.ar/digesto/or11500/or11284.asp?ver=3&resol=> Último acceso: 13/11/2020).
- Corassin CH, Bovo F, Rosim RE, Oliveira C.A.F. (2013). Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk. *Food Control*. 31, 1, 80-83. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.033>.
- Corsetti A, Gobetti M, De Marco B, Balestrieri F, Paoletti F, Russi L, Rossi (2000). Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. *J Agric Food Chem*. 48 (7), 3044-51. doi: 10.1021/jf990853e.
- Crowley P, Schober TJ, Clarke CI, Arendt EK (2002). The effect of storage time on textural and crumb grain characteristics of sourdough wheat bread. *European Food Research and Technology*. 214, 489–496.
- Dal Bello F, Clarke CI, Ryan LAM, Ulmer H, Schober TJ, Ström K (2007). Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *Journal of Cereal Science*. 45(3), 309–318.
- Davis Holly. (2020) *Ferment. A guide to the ancient art of culturing foods, from kombucha to sourdough*. *Chronicle books*, San Francisco. ISBN 9781452179247. 275 p.
- De Jesús, Rosa - Comunicación Personal (2014). Referente El Refugio de Rosa, Barrio Puente de Fierro.
- Deacon, J (2006). *Fungal Biology*. Blackwell publishing. 4th ed. 380 p.
- Diosma G, Romanin DE, Rey-Burusco MF, Londero A, Garrote GL (2014). Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 30, 43–53. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-013-1419-9>.
- Doerry WT (1990). Water activity and safety of baked products. American Institute of Baking Research Department Technical Bulletin, 12(6), 6.
- Doyle MP, Erickson MC (2011). Opportunities for mitigating pathogen contamination during on-farm food production. *Int J Food Microbiol*.
- Egal S, HounsaA, GongYY, Turner PC, Wild CP, Hall AJ, HellK, Cardwell KF (2005). Dietary exposure to aflatoxin from maize and groundnut in young children from Benin and Togo. *West AfrInt J Food Microbiol*. 104, 215–224.

- Eklund T (1989). Organic acid and esters. In G. W. Gould (Ed.), Mechanisms of action of food preservation procedure. New York. Elsevier, 161–200.
- Elía A (2017). Estudio de las propiedades fermentativas del kefir de agua y de la capacidad antifúngica de sus productos fermentados. Prácticas finales de la Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 26 p.
- El-Ziney M (1998). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria metabolites: The role of lactic acid enterocin 5701 and reuterin. Ph.D. Thesis, University of Gent, 3-23.
- European Union, 1995, 2008 - European Union Annex II of Regulation (EC) 1333/2008 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32008R1333#d1e32-31-1> (Último acceso: 10/11/2020).
- Fiorda FA, de Melo Pereira GV, Thomaz-Soccol V, Rakshit SK, Pagnoncelli MGB, Vandenberghe LP de S, Soccol CR (2017). Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microbiol.* 66, 86–95.
- Font de Valdez G, Torino MI, Gerez L, Rollán G, Obregozo M (2008). INTI boletín informativo. Desarrollo de un fermento láctico bioconservante para panificados. CERELA-CONICET, Tucumán.
- Franzetti L, Galli A, Pagani MA, De Noni I (1998). Microbiological and chemical investigations on “Sugary Kefir” drink. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia.* 48, 67 – 80.
- Fundación Universitaria Iberoamericana (FUNIBER). www.composicionnutricional.com/alimentos (Último acceso: 11/11/2020).
- Galdeano CM, Perdigon G (2006). The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 219–226. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.13.2.219-226.2006>.
- Galli A, Fiori E, Franzetti L, Pagani MA, Ottogalli G (1995) Composizione microbologica e chimica dei granuli di kefir “di frutta”. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia.* 45, 85 – 95.
- Gamba R, Yamamoto S, Sasaki T, Michihata T, Mahmoud A-H, Koyanagi T, Enomoto T (2019). Microbiological and functional characterization of kefir grown in different sugar solutions. *Food Science & Technology Research.* 25 (2), 303-312.
- Gamba RR, Caro CA, Martínez OL, Moretti AF, Giannuzzi L, De Antoni GL, León Peláez A (2016b). Antifungal effect of kefir fermented milk and shelf life improvement of corn arepas. *Int J Food Microbiol.* 235, 85 – 92. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.038.
- Gamba RR, De Antoni G, León Peláez A (2016a). Whey permeate fermented with kefir grains shows antifungal effect against *Fusarium graminearum*. *J. Dairy Res.* 83,249-255. <https://doi.org/10.1017/S0022029916000121>.

- Gamba RR, Moure C, Diosma G, Giannuzzi L, De Antoni GL, León Peláez A (2016c). Application of Whey Permeate Fermented with Kefir Grains for the Shelf-Life Improvement of Food and Feed. *Adv Microbiol.* 6 (9), 650-661.
- Gamba RR, Ni Colo C, Correa M, Astoreca A, Alconada T, De Antoni G, Peláez AL (2015). Antifungal Activity against *Aspergillus parasiticus* of Supernatants from Whey Permeates Fermented with Kefir Grains. *Advances in Microbiology.* 5, 479-492. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2015.56049>.
- Gamba RR, Yamamoto S, Abdel-Hamid M, Sasaki T, Michihata T, Koyanagi T, Enomoto T (2020). Chemical, Microbiological, and Functional Characterization of Kefir Produced from Cow's Milk and Soy Milk. *Int J Microbiol.* Article ID 7019286, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/7019286>
- Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL (2001a). Chemical and microbiological characterization of kefir grains. *Journal of Dairy Research.* 68, 639 – 652.
- Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL (2001b). Aspectos probióticos y tecnológicos de leches fermentadas con gránulos de kefir. *Industria Lechera* N° 730: 10 – 18.
- Gerez CL, Torino MI, Rollán G, Font de Valdez G (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control.* 20, 144-148.
- Giraffa G (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol Rev.* 28, 251–260. doi:10.1016/j.femsre.2003.10.005.
- Gonda M, Garmendia G, Rufo C, León Peláez A, Wisniewski M, Droby S, Vero S (2019). Biocontrol of *Aspergillus flavus* in Ensiled Sorghum by Water Kefir Microorganisms. *Microorganisms.* 7, 253. doi:10.3390/microorganisms7080253
- Gravesen S, Frisvad JC, Samson RA (1994). *Microfungi.* Munksgaard. Copenhagen.
- Gray JA y Berniller JN (2003). Bread staling: Molecular basis and control. *Critical Reviews in Food Science & Technology.* 2, 1-21.
- Graz M, Hunt A, Jamie H, Grant G, Milne P (1999). Antimicrobial activity of selected cyclic dipeptides. *Pharmazie.* 54, 772–775.
- Griem VW (1985). Tumorigenic effects in the mucosa of the forest omach of rats in feeding experiments with propionic acid. *Bundesgesundheitsblatt.* 23, 322–327.
- Gulitz A, Stadie J, Ehrmann MA, Ludwig W, Vogel RF (2013). Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1082–1091. doi: 10.1111/jam.12124.
- Gulitz A, Stadie J, Wenning M, Ehrmann MA, Vogel RF (2011). The microbial diversity of water kefir. *Int. J. Food. Microbiol.* 151, 284–288. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016.

- Hammes WPyGañzle MG (1997). Sourdough breads and related products. In: Wood, B.J.B. (Ed.), *Microbiology of Fermented Foods*. Second ed., vol. 1. Blackie Academic and Professional, London, pp. 199–216.
- Haskard CA, Binnion C, Ahokas J (2000). Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico Biological Interactions*.128, 39 – 49.
- Havelaar AH, Brul S, de Jong, A, de Jonge R, Zwietering MH, Ter Kuile BH (2010). Future challenges to microbial food safety. *Int J Food Microbiol*. 139 (1), 79-94.
- Horisberger M (1969). Structure of the dextran of the Tibi grains. *Carbohydrates Research*. 10, 379 – 385.
- Hough G (2011). Curso-Taller de análisis sensorial de alimentos. Maestría en Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de La Plata. La Plata 14,15 y 16 de Noviembre 2011. 139 p.
- IARC (1993). Aflatoxins: Naturally occurring aflatoxins (Group 1), aflatoxinas M1 (Group 2B), Vol. 56. The International Agency for Research on Cancer, p. 245.
- Informe del Ministerio de Trabajo, Empleo y Seguridad Social (MTEySS), año 2016. <https://www.argentina.gob.ar/trabajo>(Último acceso: 10/11/2020).
- Informes Técnicos del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC), años 2018 y 2019. <https://www.indec.gob.ar/indec/web/Institucional-Indec-InformesTecnicos>(Último acceso: 10/11/2020).
- Iraporda C (2010). Caracterización química y microbiológica de gránulos de Kefir de Agua y su producto fermentado. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Ismaiel AA, Ghaly MF, El-Naggar AK (2011). Milk kefir: ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. *Curr Microbiol*. 62, 1602-1609.
- Kabara J y Eklund T (1991). Organic acid and esters. In N. J. Russel & G. W. Gould (Eds.), *Food preservatives* (pp. 44–71). London: Blackie.
- Koutinas AA, Athanasiadis I, Bekatorou A, Iconomopoulou M, Blekas G (2005). Kefir Yeast Technology: Scale-Up in SCP Production Using Milk Whey. *BiotechnolBioeng*. 89 (7), 788–796.
- Lacunza A. - Comunicación personal (2020). Referente Casita Villa Elisa, Villa Elisa.
- Laureys D y De Vuyst L (2014). Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Appl. Environ. Microbiol*. doi:10.1128/AEM.03978-13.
- Laureys D y De Vuyst L (2017). The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. *J. Appl. Microbiol*. 122, 719–732. doi: 10.1111/jam.13370.
- Laureys D, Aerts M, Vandamme P, De Vuyst L (2018). Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food Microbiol*. 73, 351–361. doi: 10.1016/j.fm.2018.02.007.

- Laureys D, Cnockaert M, De Vuyst L, Vandamme P (2016). *Bifidobacterium aquikefiri* sp. nov., isolated from water kefir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1281–1286. doi: 10.1099/ijsem.0.000877.
- Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A, Gobetti M (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21 B. *Applied and Environmental Microbiology.* 66, 4084–4090.
- Legan JD (1993). Mould spoilage of bread: The problem and some solutions. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 32, 33–53.
- Legan JD, Voysey PA (1991). Yeast spoilage of bakery products and ingredients. *Journal of Applied Bacteriology.* 70, 361–71.
- León Peláez AM (2013). Estudio de la capacidad de los microorganismos del kefir, para inhibir el desarrollo fúngico y para secuestrar micotoxinas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- León Peláez AM, Montoya COI, Motato KE, Granda DM, Acaro CA, Restrepo JM, Echeverri S, Valencia J, Quinchía L (2006). Colombian wild lactic acid bacteria (lab) show good properties in sourdough manufacture. *Vitae.* 13, 26-35. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. https://www.researchgate.net/publication/236953064_COLOMBIAN_WILD_LACTIC_ACID_BACTERIA_LAB_S_HOW_GOOD_PROPERTIES_IN_SOURDOUGH_MANUFACTURE (Último acceso: 10/11/2020).
- León Peláez AM, Serna Cataño CA, Quintero Yepes EA, Gamba Villarroel RR, De Antoni GL, Giannuzzi L (2012). Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. *Food Control.* 24, 177-183.
- Leroi F, Pidoux M (1993a). Detection of interactions between yeast and lactic acid bacteria isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Bacteriology.* 74, 48 – 53.
- Leroi F, Pidoux M (1993b). Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Bacteriology.* 74, 54 – 60.
- Lindgren SE, Dobrogosz WJ (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews.* 87, 149–163.
- Liu J-R, Chen M-J, Lin C-W (2005). Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *J Agric Food Chem.* 53, 2467–2474.
- Londero A (2012). Alimentos funcionales: Obtención de un producto probiótico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismos de kefir. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Londero A, León Peláez A, Diosma G, De Antoni G, Abraham A, Garrote G (2014). Fermented whey as poultry feed additive to prevent fungal contamination. *J. Sci. Food Agric.* DOI 10.1002/jsfa.6669.

- Luz C, Izzo L, Ritieni A, Mañes J, Meca G (2020). Antifungal and antimycotoxigenic activity of hydrolyzed goat whey on *Penicillium* spp: An application as biopreservation agent in pita bread *Lebensmittel-Wissenschaft + [i.e. und] Technologie* 118, 108717. doi: [10.1016/j.lwt.2019.108717](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108717)
- Luz C, Rodriguez L, Romano R, Mañes J, Meca G (2020). A natural strategy to improve the shelf life of the loaf bread against toxigenic fungi: The employment of fermented whey powder. *Int J Dairy Technol*, 73, 88-97. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12660>
- MacFabe DF, Cain DP, Rodriguez-Capote K, Franklin AE, Hoffman JE, Boon F (2007). Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: Possible role of short-chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. *Behavioral and Brain Research*. 176(1), 149–169.
- Magalhães KT, de M Pereira GM, Dias DR, Schwan RF (2010). Microbial communities and chemical changes during fermentation on sugary Brazilian kefir. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 26, 1241 – 1250.
- Magnusson J (2003). Antifungal activity of lactic acid bacteria. Ph.D. Thesis, Agraria 397, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Magnusson J, Schnûrer J (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (1), 1-5.
- Marsh AJ, O’Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD (2013). Sequence based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS Microbiol. Lett.* 348, 79–85. doi: [10.1111/1574-6968.12248](https://doi.org/10.1111/1574-6968.12248).
- Matissek R, Schnepel FM, Steiner G (1998). Análisis de los alimentos. Fundamentos, métodos, aplicaciones. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España. I.S.B.N.: 84-200- 0850-8.
- Miller JD (1991). Significance of mycotoxins for health and nutrition. In: B.R. Champ, E. Highley, A.D. Hocking & J.I. Pitt (editors), *Fungi and Mycotoxins in Stored Products*. ACIAR Proceedings 36. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, 126- 135.
- Molina M, Giannuzzi L (1999). Combined effect of temperature and propionic acid concentration on the growth of *Aspergillus parasiticus*. *Food Research International*. 6, 677-682.
- Moure C (2013). Estudio de la capacidad fermentativa de permeado de suero por gránulos de kefir y sus microorganismos. Evaluación de la actividad antifúngica del permeado fermentado y su efecto en la vida útil de un producto panificado. Trabajo Final de Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 84 p.
- Niku-Paavola ML, Laitila A, Mattila-Sandholm T, Haikara A (1999). New types of antimicrobial compound produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*. 86, 29–35.

- Okkers DJ, Dicks LMT, Silvester M, Joubert JJ, Odendaal HJ (1999). Characterisation of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology*. 87, 726–734.
- Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura (FAO). http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/bases/alimento/comp.htm (Último acceso: 08/11/2020).
- Pateras IMC (1998). Bread spoilage and staling. In: Cauvain, S.P., Young, L.S. (Eds.), *Technology of bread making*. Blackie Academic and Professional, London pp. 240–261.
- Pateras MCI (2007). Bread spoilage and staling. In: *Technology of Bread making*. Cauvain, S.P. & Young, L.S. (Eds.). Blackie Academic and Professional, London, 240-261.
- Peltonen K, El-Nezami H, Haskard C, Ahokas J, Salminen S (2001). Aflatoxin B1 Binding by Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*. 84, 2152–2156.
- Pestka JJ, BondyGS(1994). Immunotoxic effects of mycotoxins. In: J.D. Miller & H.L. Trenholm (editors), *Mycotoxins in Grain. Compounds other than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, 339- 358.
- Piard JC, Desmazeaud M (1991). Inhibition factors produced by lactic acid bacteria: Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*. 71, 525–541.
- Pidoux M (1989). The microbial flora of sugary kefir grain (the ginger beer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *MIRCEN Journal*. 5, 223 – 238.
- Pidoux M, Brillouet JM, Quemener B (1988). Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. *Biotechnology Letters*. 10(6), 415 – 420.
- Pidoux M, Marshall VM, Zanoni P, Brooker B (1990). Lactobacilli isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation. *Journal of Applied Bacteriology*. 69, 311 – 320.
- Pizzolitto R, Armando M, Salvano M, Dalcero A, Rocha ROSA, C. (2013). Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* as an antiaflatoxicogenic agent in broiler feedstuffs. *Poultry science*. 92. 1655-1663. 10.3382/ps.2012-02846.
- Plessas S, Pherson L, Bekatorou A, Nigam P, Koutinas AA (2005). Bread making using kefir grains as baker's yeast. *Food Chemistry*. 93 (4), 585-589. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.034>.
- Ponte JG, Tsen CC (1978). Bakery products, in *Food and Beverage Mycology* (ed. L.R. Beuchat), AVI Publishing Co., Westport, CT, 191–223.
- Poute JG, Tsen CC (1987). Bakery products. In: Beuchat, L.R. (Ed.), *Food and Beverage Mycology*, Second ed. AVI Van Nostrand Reinhold, NewYork pp. 233–267.
- Prelusky DB, Rotter BA, Rotter RG (1994). Toxicology of mycotoxins. In: J.D. Miller & H.L. Trenholm (editors), *Mycotoxins in Grain. Compounds other than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, 359-403.

- Priftis KN, Panagiotakos DB, Antonogeorgos G, Papadopoulos M, Charisi M, Lagona E, Anthracopoulos MB (2007). Factors associated with asthma symptoms in schoolchildren from Greece: the Physical activity, Nutrition and Allergies in Children Examined in Athens (PANACEA) study. *Journal of Asthma*. 44, 521–527.
- Röcken W (1996). Applied aspects of sourdough fermentation. *Advances in Food Science*. 18, 212–216.
- Röcken W, Voysey PA (1995). Sourdough fermentation in bread making. *Journal of Applied Bacteriology*. 79, 38S–48S.
- Rosa DD, Dias MMS, Grzeškowiak ŁM, Reis SA, Conceição LL, Peluzio MCG (2017). Mil kkefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr. Res. Rev.* 30, 82–96.
- Ryan LAM, Dal Bello F, Arendt EK, Koehler P (2009a). Detection and quantitation of 2,5-diketopiperazines in wheat sourdough and bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 9563–9568.
- Ryan LAM, Dal Bello F, Czerny M, Koehler P, Arendt EK (2009b). Quantification of phenyllactic acid in wheat sourdough using high resolution gas chromatography-mass spectro. *J. Agric. Food Chem.* 57 (3), 1060–1064 <https://doi.org/10.1021/jf802578e>
- Sangmanee P, Hongpattarakere T. (2014). Inhibitory of multiple antifungal components produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*. 40, 224-233. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.005>.
- Schnürer J y Magnusson J (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci Technol*. 16, 70–78.
- Scott PM (1991). Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins in cereal grains. In: J. Chelkowski (editor), *Cereal Grain. Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage*. Elsevier, Amsterdam, 529-572.
- Segura, R. (2011). La trama relacional de la periferia de la ciudad de La Plata. La figuración “establecidos-outsiders” revisitada. *Publicar*. X, 85-106.
- Shetty P, Hald B, Jespersen L. (2007). Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 41-46.
- Sirakou (2019). Sugary Kefir: Microbial Identification and Biotechnological Properties. *Beverages* 5, 61; doi:10.3390/beverages5040061
- Sjögren J, Magnusson J, Broberg A, Schnürer J, Kenne L (2003). Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 7554–7557.

- Stadie J, Gulitz A, Ehrmann MA, Vogel RF (2013). Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiol.* 35, 92–98. doi: 10.1016/j.fm.2013.03.009.
- Stiles ME (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70, 331–345.
- Ström K, Schnürer J, Melin P (2005). Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. *FEMS Microbiology Letters.* 246, 119–124.
- Ström K, Sjögren J, Borberg A, Schnürer J (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-PheL-Pro) and ciclo (Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl Environ Microb.* 68, 4322-4327.
- Teixeira KM, Pereira G, Dias D, Schwan R (2010). Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World J Microb Biot.* (26), 1241-1250.
- Tipples KH (1995). Quality and nutritional changes in stored grain. In: D.S. Jnyas. N.D.G. White & W.E. Muir (editors). *Stored Grain Ecosystems.* Marcel Dekker. New York. 325-351.
- USDA (2018). National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release. Available at: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>
- Valiente C (2015). Aislamiento e identificación de la microbiota presente en productos de panadería. Prácticas finales de la Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Vega O, De Marco R, Di Risio C (2015). Propiedades físicas y sensoriales de un pan fresco con la adición de las enzimas lacasa, xilanasas y lipasa. *Revista EIA, ISSN 1794-1237 / Año XII / 12 (24),* 87-100.
- Verce M, De Vuyst L, Weckx S (2019). Shotgun Metagenomics of a Water Kefir Fermentation Ecosystem Reveals a Novel *Oenococcus* Species. *Front Microbiol.* 10, 479. doi: 10.3389/fmicb.2019.00479.
- Virzi, P. (2017). Estudio de las propiedades fermentativas y antifúngicas del Kefir de Agua. Trabajo final de Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.
- Waldherr FW, Doll VM, Meibner D, Vogel RF (2010). Identification and characterization of glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiology.* 27(5), 672 – 678.
- Yang Y, Shevchenko A, Knaust A, Abuduresule I, Li W, Hu X, Wang Ch, Shevchenko A (2014). Proteomics evidence for kefir dairy in Early Bronze Age China. *Journal of Archaeological Science.* 45, 178 – 186.
- Zamberi NR, Abu N, Mohamed NE, Nordin N, Keong YS, Beh BK, Zakaria ZAB, Nik Abdul Rahman NMA, Alitheen NB (2016). The antitumorigenic and antiangiogenic effects of kefir water on murine breast cancer cells. *Integr. Cancer Ther.* 15, 1–14.

- Zanirati DF, Abatemarco MJr, de CiccoSandes SH, Nicoli JR, CantiniNunes A, Neumann E (2015). Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*. 32, 70-76, ISSN 1075-9964. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.12.007>.
- Zapata M. Reunión equipo "Mujeres cuidadoras de la vida". Corporación REGIÓN, Medellín. Marzo 9 de 2020.

8. ANEXO 1

COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Agua de peptona al 0,1% p/v

Componente	Peso (g)
Peptona	1
Agua Destilada	1000 ml

Preparación

Se disuelve la peptona (previamente pesada en balanza analítica) en el agua destilada y se lleva a esterilización a 121 °C por 15 minutos.

Medio AAB para bacterias ácido acéticas (Carr y col. 1979)

Componente	Peso (g)
Extracto de levadura	30
Solución de Verde de Bromocresol	1
Agar	20
Etanol	20
Agua	1000 ml

Preparación

Se disuelven el extracto de levadura y el agar (previamente pesados en balanza analítica) en el agua destilada y se lleva a esterilización a 121 °C por 15 minutos. En cabina de flujo laminar, se esteriliza por filtración el alcohol que se adiciona al medio. El colorante se prepara a razón de 0,22g verde de bromocresol/11 ml de etanol seguido de esterilización por filtración.

Una vez esterilizado el medio, se deja que llegue a 45-50 °C, momento en el cual se le agrega el alcohol y el colorante, en esterilidad. Se mezcla, cuidando de no generar burbujas, y finalmente se plaquea antes de su solidificación.

Solución de esporas (León y col. 2012)

Componente	Peso (g)
Lauril sulfato de sodio	0,1
Solución de glucosa	10
Agua Destilada	1000 ml

Preparación

Se disuelven el Lauril sulfato de sodio y la solución de glucosa (previamente pesados en balanza analítica) en el agua destilada y se lleva a esterilización a 121 °C por 15 minutos.

Agar agua (León y col. 2012)

Componente	Peso (g)
Agar agar	2
Agua	1000 ml

Preparación

Se disuelve el agar agar (previamente pesado en balanza analítica) en el agua destilada y se lleva a esterilización a 121 °C por 15 minutos.

➤ Los medios de cultivo que vienen formulados se prepararon de acuerdo a las indicaciones dadas por el fabricante.

CONSERVACIÓN DE LOS HONGOS

Una vez preparado el Agar agua (León y col. 2012), se agrega 1 o 2 ml a cada CRIOVIAL previamente esterilizados por vapor fluente durante 30 min. (semi abierto o 3/4 de vuelta si es tapa rosca). Se corrobora que los hongos en las placas estén bien esporulados, y se toma una buena cantidad de conidios con un ansa ojal, depositándola en el criovial. Finalmente, se conservan en heladera (no Frezzer).

FLUJOGRAMA DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE PAN DULCE

