

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo realizado como requisito para optar al título de

DOCTOR EN BACTERIOLOGIA CLINICA E INDUSTRIAL

" Microflora de masas de panadería "

Doctorando : Bact. Rosalía FRITZ

Director : Dra María Cristina AÑON

Co-director : Dra Graciela Araceli OLIVA

Lugar de trabajo : Departamento de Química. Facultad de  
Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad Nacional de Mar del Plata

Miembros del Jurado : Dra Marta Tobía  
Dr Jorge Lasta  
Dr Florestan Málendi  
Dr Héctor Petinatto  
Dr Enso Reinoso

1997

Mi agradecimiento

A la Dra María Cristina Añón quien me brindó su experiencia, calidez y ayuda incondicional.

A Graciela Oliva quien con su amistad y estímulo me ayudó a seguir adelante.

A mis compañeros y grupo de trabajo por su ayuda y comprensión.

Al Depto de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la Universidad Nacional de Mar del Plata, por brindarme el lugar de trabajo, el instrumental y los medios necesarios.

A la Universidad Nacional de Mar del Plata por financiar este proyecto.

*A mi esposo e hijos*

**TITULO :** Microflora de masas de panadería

**PALABRAS CLAVE :** Microflora, masas de panadería, propiedades funcionales, calidad del pan.

## RESUMEN

Se estudió la microflora de las masas durante el proceso de panificación y se analizó la incidencia de las características fisiológicas y bioquímicas de los microorganismos, sobre sus propiedades funcionales y sobre la calidad del pan.

Se prepararon masas con y sin levadura de panificación (*S.cerevisiae*) y masas con ingredientes estériles a las que se le incorporaron cepas de microorganismos puros. Se realizaron recuentos, aislamientos y caracterización de los microorganismos a lo largo del proceso. Se examinaron los cambios de pH, acidez y levado de las masas y se evaluaron la capacidad amilolítica, proteolítica, lipolítica y fermentativa de los microorganismos.

La calidad del producto final se determinó midiendo el volumen de los panes, altura de la rebanada, relación corteza-miga y evaluando atributos sensoriales como aroma, color, esponjosidad, etc.

Sobre 50 aislamientos de *Lactobacillus* realizados se identificaron *L.plantarum* 40 %, *L.brevis* 35 %, *L.casei casei* 6%, *L.confusus* 2 %, correspondiendo el resto de las especies a no identificadas. No se detectó *Streptococcus sp* en ninguna de las muestras.

De 10 aislados de *Micrococcus*, 4 correspondieron a *M.luteus*, 3 a *M.lyl-lae*, 2 a *M.kristinae* y uno no pudo identificarse. Los conteos de *Bacillus sp* y los de mohos fueron poco significativos. Solamente de las harinas pudieron aislarse *B. subtilis* y *B.megaterium*.

Los lactobacilos presentaron mayor actividad amilolítica y proteolítica que los micrococos. Ningún microorganismo mostró capacidad lipolítica. Las pruebas de fermentación de los azúcares mostraron resultados variables. Se registraron variaciones particulares de pH y acidez para masas con levadura y *L.plantarum*, con levadura y *L.brevis*, con levadura sin agregado de microorganismos y sin levadura. También se examinaron los cambios de recuentos en masas inoculadas con estos microorganismos en presencia y ausencia de levadura.

Además se observaron diferencias en la calidad de los panes, en cuanto a volumen, textura y atributos sensoriales.

Las masas preparadas con *L.brevis* mostraron valores mayores de acidez y descenso de pH y las adicionadas de *L.plantarum* dieron origen a panes de mejor textura, altura y volumen.

La combinación de *L.plantarum* y *S.cerevisiae* mostró los mejores resultados.

**TITLE :** Microflora of the sour-doughs bread (bakery doughs)

**KEY WORDS :** Microflora- sour doughs bread (bakery dough) -functional properties- bread quality.

**SUMMARY :**

The microflora of the doughs during bakery process was studied. The incidence of biochemical and physiological characteristics of the microorganisms on doughs functional properties and bread quality was analyzed.

Doughs with and without baker's yeast (*S.cerevisiae*) and doughs made with sterile ingredients and added with pure microorganisms cultures were prepared.

Counting, isolation and characterization of the microorganisms along the process were carried out. The pH changes, acidity and rising of the doughs as well as amylolytic, proteolytic, lipolytic and fermentative capacities of the microorganisms were examined.

Final product quality was determined using parameters as loaf volume, slice height, crust- crumb relationship and evaluating sensorial attributes such as aroma, color, sponginess, etc.

Over a total of 50 *Lactobacillus* isolations done, were identified: *L.plantarum* 40%, *L.brevis* 35%, *L casei casei* 6%, *L.confusus* 2%, being the rest non-identified species. No *Streptococcus sp* was identified in any sample.

From 10 *Micrococcus* isolations carried out, 4 corresponded to *M.luteus*, 3 to *M.lylae* and 2 to *M.kristinae* remaining 1 non-identifiable. *Bacillus sp* and molds counts resulted no significant. *B.subtilis* and *B.megaterium* could be only isolated from flours.

*Lactobacillus* presented higher amylolytic and proteolytic activities than *Micrococcus*. No microorganisms exhibited lipolytic activity. Carbohydrates fermentation tests showed variable results. Particular variations of pH and acidity were registered for the doughs containing : yeast and *L.plantarum*, yeast and *L.brevis*, only yeast and no yeast. Changes of microorganisms counts in doughs inoculated with *L.Plantarum* and *L.brevis* with and without baker's yeast were examined too.

Bread quality differences concerning to loaf volume, texture and sensorial attributes were also observed.

Doughs prepared with *L.brevis* showed higher acidity values and pH decrease and those added with *L.plantarum* produced breads of improved texture, height and volume.

Better results were obtained using *L.plantarum* and *S.cerevisiae* mixture.

# INDICE

Página

## Introducción

1.- El proceso de panificación	1
2.- Componentes de la harina y su papel en la panificación	2
2.1.- Proteínas	2
2.2.- Componentes lipídicos	4
2.3.- Carbohidratos	5
3.- Actividad enzimática	6
4.- Absorción de agua	10
5.- Microflora de las masas	10
5.1.- El sistema fermentativo	10
5.2.- Datos cualitativos de los microorganismos	11
5.2.1.- Las levaduras	11
5.2.2.- Las bacterias	11
5.3.- Efectos e interacciones de la microflora	12

## Objetivo

Objetivo general y objetivos parciales	16
--	----

## Materiales y Métodos

1.- Harina de trigo	17
2.- Levadura	17
3.- Ensayos de panificación	17
4.- Medidas de pH	18
5.- Ensayos microbiológicos	18
6.- Determinación de la calidad de los panes	18
7.- Determinación de la composición química de las harinas	18
7.1.- Proteínas	18
7.2.- Humedad	19
7.3.- Cenizas	19
8.- Ensayos alveográficos	19
8.1.- Cálculo de la capacidad de absorción de agua	19
8.2.- Determinación del tiempo de amasado	19
8.3.- Fijación del tiempo de prefermentación y fermentación	20
9.- Prueba de la calidad o fuerza de la levadura	20
10.- Ensayos de panificación	21

11.4.2.q.- Hidrólisis del almidón	30
11.4.2.r.- Hidrólisis de la gelatina	30
11.5.2.s.- Producción de fosfatasa	30
11.4.3.- Caracterización de <i>Bacillus sp</i>	30
11.4.3.a.- Formación de endosporos	31
11.4.3.b.- Coloración de Gram	31
11.4.3.c.- Crecimiento aeróbico	31
11.4.3.d.- Desarrollo en medios básicos, sin agregado de factores de crecimiento	31
11.4.3.e.- Prueba de la catalasa	31
11.4.3.f.- Prueba de la oxidasa	31
11.4.3.g.- Reacción de Voges Proskauer	31
11.4.3.h.- Reducción de nitratos a nitritos	31
11.4.3.i.- Producción de ácido de carbohidratos	31
11.4.3.j.- Hidrólisis de gelatina y caseína	32
11.4.3.k.- Hidrólisis del almidón	32
11.4.3.l.- Hidrólisis de la esculina	32
11.4.3.m.-Hidrólisis del tween 80	32
11.4.3.n.- Utilización del citrato	32
11.4.3.o.- Crecimiento a pH 5 y 6,8	32
11.4.3.p.- Actividad de lipasas	32
11.4.4.- Caracterización de coliformes y coliformes fecales	32
11.4.4.a.- Investigación de indol	32
11.4.4.b.- Reacción del rojo de metilo	33
11.4.4.c.- Reacción de Voges Proskauer	33
11.4.4.d.- Utilización del citrato	33
11.4.5.- Caracterización de mohos y levaduras	33
<b>12.- Preparación de masas de panadería con especies puras</b>	<b>33</b>
12.1.- Esterilización de las harinas	34
12.1.1.- Aplicación de calor	34
12.1.2.- Esterilización por luz ultravioleta	34
12.1.3.- Utilización de microondas	34
12.2.- Preparación de los microorganismos	35
12.2.1.- Cultivos para la producción de biomasas	35
12.2.2.- Concentración de los microorganismos	35
12.2.3.- Incorporación de las cepas a las masas	35
<b>13.- Efecto de los microorganismos en las masas</b>	<b>35</b>
13.1- Determinación de pH y acidez	36
13.2.- Actividad amilolítica	37
13.2.1.- Extracción de los carbohidratos	37
13.2.2.- Dosaje de los carbohidratos	38
13.2.3.- Determinación de almidón remanente	38
13.2.4.- Extracción de amilasas extracelulares	38
13.2.5.- Determinación de grupos terminales de almidón (cortes de cadena) por oxidación con periodato	39
13.2.5.a.- Reactivos	39
13.2.5.b.- Procedimiento	39
13.2.5.c.- Cálculos	39

13.2.6.- Actividad diastásica en la harina	40
13.2.6.a.- Determinación	40
13.2.6.b.- Valoración de azúcares reductores	40
13.2.6.c.- Reactivos	40
13.2.6.d.- Procedimiento para azúcares reductores	40
13.3.- Actividad proteolítica	41
13.3.1.- Medición de la actividad proteolítica	41
13.4.- Actividad lipolítica	42
13.5.- Pruebas de fermentación de carbohidratos	42
14.- Evaluación de la calidad de los panes	42
14.1.- Medición de volumen	42
14.2.- Relación corteza-miga	43
14.3.- Densidad	43
14.4.- Atributos sensoriales	43
15.- Análisis estadísticos	43

## Resultados y discusión

1.- Caracterización de las muestras de harina	44
1.1.- Composición química	45
1.2.- Datos microbiológicos de las harinas	45
1.3.- Aislamiento de mohos	47
1.3.1.- Características macroscópicas y microscópicas	47
2.- Datos alveográficos	49
3.- Microflora de las masas	50
3.1.- Recuentos microbiológicos	51
- en masas con levadura	51
- en masas sin levadura	53
3.2.- Evolución de la microflora a lo largo del proceso	55
3.3.- Caracterización de los microorganismos	59
4.- Efecto de los microorganismos en las masas	66
4.1.- Acción de los microorganismos sobre sustratos básicos	66
4.1.1.- Actividad amilolítica	67
4.1.2.- Actividad proteolítica	69
4.1.3.- Actividad lipolítica	80
4.1.4.- Fermentación de carbohidratos	80
5.- Preparación de las masas con especies o cepas puras	82
5.1.- Esterilización de las harinas	82
5.1.1.- Aplicación del calor	82
5.1.2.- Exposición a la luz ultravioleta	83
5.1.3.- Utilización de microondas	84
5.2.- Características de las masas preparadas con especies puras	86
5.2.1.- Cambios de pH y acidez valorable a lo largo del proceso	86
5.2.2.- Cambios en los valores de recuento durante el proceso	89
5.2.3.- Valores de pH frente a soluciones de glucosa al 10 % p/v	91
5.2.4.- Valores de pH, acidez valorable y volumen de las masas	91



<b>6.- Calidad de los panes</b>	<b>96</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>102</b>
<b>Apéndice</b>	<b>104</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>115</b>

## INTRODUCCION

## 1.- El proceso de panificación

Los estudios relacionados con el proceso de panificación comenzaron en 1938. Finney y Barmore en 1939, 1943, 1944 y 1945 publicaron sus primeros trabajos en los cuales describieron un método experimental que permitió estudiar el volumen de pan, la textura de la miga y otras propiedades características de la masa. También evaluaron algunos parámetros como temperatura, absorción de agua de la harina, potencial de la levadura y efecto de determinados ingredientes esenciales. A partir de entonces fueron numerosas las investigaciones que se desarrollaron en este campo. De ellas surgió que la harina de endospermo de trigo es la más apta para el proceso de panificación y obtención de productos horneados.

También resultan aptas para la panificación las harinas integrales, obtenidas del grano entero de trigo, las de centeno, las de cebada y las de gluten, ya sea solas o combinadas.

Las harinas de endospermo de trigo ocupan una posición destacada respecto a las otras harinas panificables, debido a que por sí solas son capaces de formar con agua, sal y levadura, la masa panaria.

La mayor parte de los constituyentes de la harina contribuyen al proceso de panificación. No obstante, debido a sus propiedades viscoelásticas características, las proteínas son las responsables principales de la capacidad de las harinas de originar una buena masa (Pomeranz 1978 y 1985 a, Fennema 1985 a y b, He y Hosenev 1991).

Durante el proceso de panificación, los componentes básicos de las masas, harina, sal, azúcar y agua, se amasan durante 10-20 minutos. El amasado permite la absorción de agua, de parte de las proteínas y de los gránulos de almidón triturados y origina extensibilidad y elasticidad en el gluten, debido a la oxidación de grupos SH- y reagrupamientos de uniones -S-S. La actividad de las  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas de las harinas produce, desde el inicio del amasado, una cantidad importante de azúcares fermentables bajo la forma de maltosa o isomaltosa. La incorporación posterior de la suspensión en agua de la levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) y el mantenimiento de la masa a una temperatura de 25-30 ° C, permite que ésta, más los microorganismos presentes, provenientes de la harina, produzcan la fermentación de los azúcares existentes (maltosa, sacarosa, glucosa, etc) (Saunders y col. 1972, Langemeier y Rogers 1995). Durante este proceso que dura 2 ó 3 horas, se origina CO<sub>2</sub> y etanol principalmente y la masa crece por formación de bolsas o vacuolas de gas, que quedan retenidas entre las finas membranas de gluten, dando origen a lo que se conoce como levado de la masa (Pomeranz y col. 1984, Gan y col. 1989)

La cocción posterior fija la estructura esponjosa por coagulación de algunas proteínas, sobretodo albúminas y globulinas (Fennema 1985 a y b) o por formación de uniones puente hidrógeno entre glicolípidos, almidón y proteínas (Pomeranz y col. 1984, Pomeranz 1985 a). El incremento de volumen y la capacidad de retener el gas de una masa, se relaciona directamente con el volumen del pan (Finney 1984, Shogren y Finney 1984, Pomeranz 1985 a, Saiz

y col. 1996). Los azúcares fermentables preexistentes se agotan rápidamente pero las amilasas de la harina, las incorporadas como aditivos o las provenientes de los microorganismos, producen maltosa y glucosa, desde que encuentran la humedad suficiente (Pomeranz 1978). También se generan en la fermentación un número importante de componentes volátiles (alcoholes, aldehídos, etc.) que contribuyen a producir el aroma típico del pan recién cocido (Thornhill y Cogan, 1984, Hansen y Hansen 1994)

Según la calidad de la harina, las masas tendrán una determinada capacidad de levado, serán más o menos esponjosas y tras la cocción darán lugar a un pan más o menos voluminoso (Bourgeois y Larpent 1995).

## 2.- Componentes de la harina y su papel en la panificación

### 2. 1.- Proteínas

Las proteínas constituyen el 9-13 % p/p de la harina de trigo seca. El 85 % p/p de las mismas posee la característica singular de combinarse con el agua, dando lugar a una masa capaz de retener el gas, denominada gluten. La formación de esa pasta permite el aislamiento del gluten por lavado mecánico bajo corriente de agua, que arrastra el almidón y los constituyentes solubles. El gluten aislado posee propiedades plásticas características - alta cohesividad, extensibilidad y elasticidad - que son propias de la masa panaria (Fennema 1985 a y b, Buck y col. 1987, Saiz y col. 1996).

Bechtel y col. (1978) demostraron que las proteínas proveen la matriz básica que forma la estructura de la masa requiriendo, para ello, un mezclado adecuado y un nivel de fermentación mínimo que asegure la formación de vacuolas de gas (Pomeranz 1985 a)

Las proteínas del gluten pueden presentarse como monómeros asociados por uniones puente hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, formando una estructura de pliegue mantenida por uniones disulfuro intramoleculares o como polímeros de alto peso molecular unidos por uniones disulfuro intra e intermoleculares. Estos dos grupos clasificados inicialmente como prolaminas y glutelinas respectivamente, fueron definidas por Osborne (1907), sobre la base de su solubilidad e insolubilidad en alcohol-agua (etanol al 70-90 % v/v (Fennema 1985 a y b). Osborne también reconoció que las proteínas de los granos de cereales eran un grupo de proteínas estructuralmente distinto y le dió el nombre de prolaminas debido a su contenido alto en prolina y glutamina. Actualmente las prolaminas se consideran las mayores proteínas de reserva de los granos de cereales y un importante aporte para el dieta del hombre y del ganado. En adición las prolaminas son los mayores componentes del gluten y sus propiedades influyen en procesos tecnológicos como los de panadería ( Shewry y Tatham 1990)

Las propiedades físicas más importante del gluten dependen de distintas fracciones de sus proteínas : la viscosidad se asocia a las fracciones monoméricas y la elasticidad se asocia a las fracciones poliméricas (Shewry y Tatham

1990).

En relación a las masas, las primeras confieren menos cohesión y elasticidad y dan origen a una masa fluida, viscosa y extensible (Fennema 1985 a y b, Pomeranz 1985 a). Además estas proteínas controlan el volumen de pan y varían en las harinas con diferente potencial para la panificación (Pomeranz 1978 y 1985 a, He y Hosney 1991).

Las especies poliméricas son capaces de formar por hidratación, una masa compacta, elástica y de baja extensibilidad. Este es el factor que determina el tiempo de mezclado y el desarrollo de la masa (Pomeranz 1985 a).

Su conformación también está relacionada con su funcionalidad (Pezolet y col 1992) y con propiedades como solubilidad, capacidad de absorción de agua, etc. (Regenstein y Regenstein 1984).

La fracción insoluble en alcohol-agua que inicialmente se denominó gluteninas, se caracteriza por presentar algunas de sus especies muy relacionadas estructuralmente con las prolaminas, aunque no son solubles en alcohol acuoso debido a que forman polímeros de alto peso molecular estabilizados por enlaces S-S entre cadenas. Sin embargo, cuando se obtienen las subunidades reducidas de estos polímeros, estas se solubilizan, pueden extraerse en alcohol acuoso y son ricas en prolina y glutamina, por lo que se consideran también prolaminas. Estas proteínas forman corpúsculos en el endopermo almidonoso de los granos de la mayoría de los cereales y se clasifican también en fracciones o grupos. Aunque todas son solubles (como subunidades individuales) en etanol acuoso, las distintas fracciones varían en otras propiedades como peso molecular, punto isoeléctrico y composición de aminoácidos. Por ejemplo, la proporción combinada de sus dos aminoácidos más característicos, prolina y glutamina varía en un rango de 30-70 %/mol (Shewry y Tatham 1990).

La fracción de prolaminas del trigo está íntimamente relacionada con la de la cebada y el centeno y consiste en una mezcla compleja de componentes, que puede separarse por electroforesis, obteniéndose de acuerdo con su movilidad electrofóretica decreciente a pH 3, las fracciones denominadas  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadinas, cuyas masas moleculares varían entre 30.000 y 100.000 Daltons (Shewry y Tatham 1990, Autran 1994)

También se clasifican, a pesar de su alto nivel de polimorfismo, sobre la base de su composición en aminoácidos y sus secuencias, en tres grupos principales: las ricas en sulfuro (S-rich): ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -gliadinas), las pobres en sulfuros (S-poor): ( $\omega$ -gliadinas) y las prolaminas de alto peso molecular (HMW), que corresponden a subunidades de gluteninas. También existe una fracción de gluteninas de bajo peso molecular (HLW) (Kreis y col. 1985, Shewry y Tatham 1990, Autran 1994).

El grupo de prolaminas del trigo estudiadas con más detalle, lo constituyen las subunidades de alto peso molecular (HMW) correspondientes a las gluteninas. De acuerdo con estudios genéticos basados en la secuencia de los nucleótidos del cDNA, se determinó la presencia de un ordenamiento central repetitivo, formado por tri, hepta y nonapéptidos ricos en glicina, prolina y glutamina, flaqueado por restos C-terminal y NH<sub>2</sub>-terminal no repetitivos. Esta unidad presenta una estructura supersecundaria espiralada, basada en giros re-

gularmente repetidos (Tatham y col. 1985, Shewry y Tatham 1990). Trabajos posteriores mostraron además que existe una alta homología entre esta fracción y otras prolaminas. Por ejemplo, la D-hordeína de la cebada presenta también una estructura supersecundaria espiralada semejante (Halford y col. 1992). A partir de estos estudios se ha considerado que la calidad panadera, no sólo depende de los entrecruzamientos del módulo elástico del gluten, sino también de las diferencias de tipo genético, que se relacionan con la estructura en espiral de la parte central repetitiva, que es intrínsecamente elástica (Shewry y Tatham 1990).

De acuerdo con lo descrito por Wieser (1996) y considerando que no existía una buena correlación entre los grupos de proteínas clasificados sobre la base de su estructura primaria y las separadas por electroforesis en geles de poliacrilamidas (SDS-PAGE) se ha propuesto una nueva clasificación de las gliadinas. Métodos más modernos como la electroforesis bidimensional o la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, permitieron la separación de más de cien componentes (Bietz y Simpson 1992). Ellos pueden ser clasificados de acuerdo con sus masas moleculares, su composición de aminoácidos o su secuencia, en cuatro tipos diferentes:  $\omega 5$ ;  $\omega 1,2$ ;  $\alpha$ - y  $\gamma$ -gliadinas. Las  $\alpha$ - y  $\beta$ -gliadinas caen ahora dentro de un sólo grupo, denominado  $\alpha$ -gliadinas. En estos últimos estudios se vió que la determinación de la secuencia N-terminal de estas fracciones resulta muy útil para su identificación (Wieser 1996).

Las proteínas que no forman parte del gluten, albúminas y globulinas, no intervienen en la formación de la masa y no resultan esenciales para producir el volumen normal de pan (Pomeranz 1985 a). Son solubles, coagulables y capaces de mantener fijo o estable el aspecto esponjoso a la masa (Fennema 1985 a y b)

## 2.2.- Componentes lipídicos

La harina de trigo contiene lípidos polares y no polares en cantidades relativas equivalentes. Los triglicéridos son los componentes mayoritarios de los lípidos no polares, los digalactosildiglicéridos de los glicolípidos y las lisofosfatidilcolinas y fosfatidilcolinas de los fosfolípidos (Pomeranz 1978, Primo Yúfera 1979, Pomeranz 1985 a, Fennema 1985 a y b).

Los lípidos en general son componentes menores que tienen una gran importancia en el proceso de panificación, sobretodo por la significancia de las interacciones proteína- lípido que se establecen (Pomeranz 1985 a).

Determinadas fracciones lipídicas mejoran la retención de gas de la masa y aumentan el volumen de pan. La formación y evolución de los alvéolos y espesor de los tabiques alveolares, dependen en gran parte de la etapa de fermentación y los lípidos parecen jugar un papel importante, contribuyendo a estabilizar la película superficial que los limita. Los lípidos apolares reducen el

volumen de pan y empeoran la textura de la miga; los ácidos grasos libres y en especial, el ácido linoleico, contribuyen en mayor proporción a este fenómeno.

En contraste, los lípidos polares, especialmente los glicolípidos y los fosfolípidos mejoran la estructura de la masa y su estabilidad y aumentan el volumen de pan (Tortosa y col. 1985 y 1986).

El efecto perjudicial de los lípidos no polares puede ser contrarrestado por el efecto beneficioso de los lípidos polares y las consecuencias finales sobre el volumen de pan, dependerán de los niveles de concentración de ambos tipos de compuestos, como de su relación o equilibrio (Pomeranz 1985 a).

### 2.3.- Carbohidratos

Los carbohidratos representan el 65-90 % p/p del peso seco de los cereales. El componente principal es el almidón pero contienen también hemicelulosas, celulosa y azúcares libres.

El almidón se concentra en el endospermo, los azúcares libres en el germen y las celulosa y hemicelulosas en el salvado.

Las harinas de endospermo contienen por lo tanto, muy pequeñas cantidades de estas últimas, de las cuales 0,5-0,8 % p/p son solubles. Una fracción de las mismas es una hemicelulosa pura, el resto son fracciones unidas a proteínas formando glicoproteínas.

Las hemicelulosas insolubles en agua tienen una estructura semejante a las hemicelulosas solubles pero presentan mayor grado de polimerización (Primo Yúfera 1979). La presencia en las harinas de hemicelulosas solubles en agua produce un aumento de la capacidad de absorción de agua y una disminución del tiempo de amasado, mejorando el volumen de pan y su textura. Se tiene evidencia que las fracciones glicoproteicas son las responsables de estos efectos. En contraste las hemicelulosas insolubles en agua perjudican la calidad del pan (D'Apollonia y Kim 1976, Primo Yúfera 1979, Pomeranz 1985 a, Rouav 1993).

La celulosa es un constituyente de la pared celular, representa el componente principal de las fibras y se encuentra en el grano de trigo en una proporción del 2 % p/p.

Los azúcares libres constituyen en los granos de cereales 1-3 % p/p de su peso total. El azúcar más abundante es la sacarosa, seguido de un trisacárido, la rafinosa, formada por fructosa, galactosa y glucosa. También contienen glucosa, fructosa y en algunos casos maltosa (Primo Yúfera 1979)

Los azúcares cumplen un papel importante en el proceso de panificación: contribuyen al sabor del pan, constituyen un sustrato importante para la fermentación, son en parte responsables del color de la corteza e influyen sobre la textura y aspecto del producto final horneado (Saunders y col 1972, Pomeranz 1985 a, Barber y col. 1985 a)

El papel funcional del almidón en el proceso de panificación es objeto de controversia. Algunos autores opinan que solo tiene una función pasiva,

como simple diluyente de las proteínas. Otros opinan que desempeña un papel fundamental, en aspectos como el volumen final del pan o la estructura y características de la miga (Primo Yúfera 1979).

En general se pueden señalar las siguientes funciones del almidón en el proceso de panificación: 1) diluye el gluten para dar una consistencia adecuada a la masa 2) es una fuente de azúcares que se van a utilizar en la fermentación, a través de la acción de las amilasas 3) proporciona una superficie adecuada de unión con el gluten 4) por gelatinización parcial se transforma en una masa flexible, difícil de desintegrar y 5) al gelatinizarse, absorbe agua, contribuyendo a formar una estructura permeable a los gases y evitando que en el enfriamiento de la pieza a la salida del horno, el volumen de la misma se reduzca drásticamente (Primo Yúfera 1979, Martin y Hosenev 1991, Martin y col. 1991, Inagaki y Seib 1992, Waniska y Gómez 1992, Defloor y col. 1993).

La modificación del almidón durante el proceso de panificación resulta especialmente importante por el rol que juega el almidón en los panes terminados (Kulp y Ponte 1981, Pomeranz y col. 1984, Kulp y col. 1985)

Los gránulos del almidón muestran amplias variaciones en el grado de gelatinización, con un proceso que comienza siempre en el interior de los gránulos. En el horneado del pan la mayor parte del mismo está gelatinizado dentro de las cadenas de fibras, más que en contacto con las finas cadenas de proteínas (Pomeranz y col. 1984).

El seguimiento de la gelatinización y de la actividad amilolítica durante las etapas de mezclado, amasado, fermentación y horneado resulta sumamente importante (Sievert y Pomeranz 1990).

En las etapas de amasado y fermentación se observa que los gránulos grandes y las zonas cristalinas de los gránulos pequeños son los que especialmente contribuyen a la estructura de la masa (Pomeranz y col. 1984).

Después del horneado, las interacciones ocurren especialmente entre las proteínas y los gránulos hinchados, principalmente con los gránulos grandes. Esto indica que la mayor parte del almidón está modificado. Sólo se presentan escasas modificaciones en los gránulos pequeños y en algunas zonas protegidas de la miga o dentro de las vacuolas (Pomeranz y col. 1984).

En consecuencia, a pesar de ser el almidón un componente mayoritario, sólo refuerza o contribuye en parte, a la estructura de la masa.

El rol que ejerce el almidón lógicamente se verá afectado por el pH del sistema, por la composición y formulación de la masa, por la actividad enzimática presente y por el grado de degradación mecánico o enzimático.

### 3.- Actividad enzimática

La hidrólisis del almidón a dextrinas y azúcares fermentables ocurre en las masas por la actividad de las amilasas (Reed y Thorn 1978, Primo Yúfera 1979, Kuracina y col. 1987)

Durante la fermentación solamente un pequeño porcentaje de gránulo-



los de almidón que ha sido dañado en el proceso de la molienda, es apto para el ataque de las amilasas.

En el horno, sólo en un corto tiempo es posible la hidrólisis y ello ocurre entre el inicio de la gelatinización y la inactivación de las enzimas.

Como es sabido, estas enzimas pueden ser de dos tipos:  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas. Las  $\beta$ -amilasas hidrolizan exclusivamente los enlaces  $\alpha$  1-4 glucosídicos de las moléculas de amilosa y amilopectina, con producción rápida de moléculas de maltosa. La acción de las beta-amilasas se inicia en los extremos no reductores de las cadenas, deteniéndose cuando se alcanza un enlace  $\alpha$ -1-6 glicosídico, que implica una ramificación (Primo Yúfera 1979)

Las  $\beta$ -amilasas pueden hidrolizar completamente la amilosa, el componente lineal del almidón, por no poseer ramificaciones (Primo Yúfera 1979, Mc Cleary y Cood 1989)

Estas enzimas se encuentran localizadas, fundamentalmente en el endospermo del grano de trigo. Su actividad aumenta durante la maduración del grano y se mantiene en niveles relativamente altos en el trigo maduro (Pomeranz 1978, Primo Yúfera 1979)

Las alfa-amilasas hidrolizan, de forma desordenada, las cadenas largas, atacando los enlaces internos  $\alpha$ - 1-4 glucosídicos, originando fragmentos cortos denominados dextrinas. Posteriormente, las dextrinas son hidrolizadas a moléculas de maltosa y maltotriosa (Primo Yúfera 1979, Harinder y Bains 1987)

A diferencia de las  $\beta$ -amilasas, las  $\alpha$ -amilasas hidrolizan enlaces 1-4 a ambos lados de los enlaces  $\alpha$  1-6, dando lugar a oligosacáridos con enlaces 1-6. Sin embargo no hidrolizan los propios enlaces  $\alpha$  1-6, para lo cual es necesario la acción de otras enzimas, como las glucoamilasas (amiloglucosidasas) (Primo Yúfera 1979). La actividad alfa amilásica es muy intensa durante la maduración del grano, encontrándose localizada, en este período, en las capas externas del grano. Mas tarde la actividad disminuye muy rápidamente y en el grano maduro se detectan niveles muy bajos (Meredith y Yenkin 1973)

La harina de trigo contiene normalmente, abundante beta-amilasa y poca alfa-amilasa. Esta aumenta considerablemente al germinar el trigo y por ello la harina obtenida de trigos con cantidades importantes de trigo germinado, tiene alta actividad alfa-amilásica. Esto da lugar, a que durante la cocción se transforme en dextrina una cantidad elevada de almidón, debilitando la miga y haciéndola pastosa.

Por el contrario, la harina con muy poca actividad  $\alpha$ -amilásica da una corteza pálida y poco quebradiza. En este caso, además, en las últimas fases de la fermentación, pueden faltar azúcares y por lo tanto  $\text{CO}_2$ , debido a que no se producen cadenas cortas que la beta-amilasa pueda escindir a maltosa. Así pues, una cierta actividad  $\alpha$ -diastásica es esencial, pero una actividad excesiva es perjudicial porque produce pegajosidad en la miga.

La cantidad de  $\alpha$ -amilasa en una harina que tenga poca actividad dextrinogénica puede aumentarse por adición de malta ó amilasas industriales. Las amilasas pueden afectar las propiedades de la masa de tres maneras diferentes : por la formación de azúcares que pueden ser fermentados por la levadura y microorganismos, por remoción de la fracción de almidón dañado y por la formación de dextrinas.

La formación de azúcares fermentables aumenta la capacidad de formar vacuolas de gas en la masa. Para lograr este efecto, la presencia de azúcares fermentables agregados a la masa, es más importante que la adición de las amilasas. Por ello, si un 3 a 6 % p/p de sacarosa es incluido en la fórmula, el aumento de la capacidad de formación de gas es mayor que el esperado. Bajo estas condiciones el efecto benéfico de la adición de amilasas, se relaciona sobretodo con la remoción del almidón dañado o la formación de dextrinas.

La desaparición del almidón y particularmente de los gránulos de almidón dañado, relacionadas con la mayor capacidad de absorción de agua, produce un decrecimiento de la consistencia de la masa, que puede ser medida en el farinógrafo. Por lo tanto, debe existir una cantidad limitada de este almidón, a fin de asegurar una consistencia adecuada.

El decrecimiento de la consistencia por una excesiva hidrólisis se debe especialmente a la presencia de alfa-amilasas, durante la fermentación. La adición de cantidades importantes de alfa-amilasas, a una masa obtenida con harina normal, no afecta tan adversamente las propiedades reológicas, sino están acompañadas por proteasas activas. Bajo esta condición, cantidades importantes de alfa-amilasas incrementan el volumen de pan, pero la calidad de la miga es afectada adversamente. La capacidad de retención de gas en la masa es aumentada sobretodo durante el "proofing". Esto más probablemente es debido a la formación de dextrinas que a la desaparición de la fracción de almidón dañado. La ruptura del almidón, después de que ha gelatinizado en el horno, depende de la cantidad y de la estabilidad térmica de las amilasas presentes. Alrededor de los 65 ° C el almidón nativo gelatiniza y comienza a estar apto para la acción de las amilasas. A la misma temperatura las beta-amilasas son inactivadas, pero las alfa-amilasas del trigo permanecen activas 1 ó 2 minutos más, bajo temperaturas cercanas a los 75 °C. Como vimos, una excesiva cantidad de  $\alpha$ -amilasas o la presencia de amilasas termoestables tales como algunas amilasas bacterianas puede causar excesiva liquefacción y dextrinización y producir consecuentemente una miga húmeda y pegajosa. (Pomeranz 1978 y 1985 b, Valjakka y col. 1994)

Por otro lado, la adición de proteasas o la incorporación de microorganismos proteolíticos decrece la consistencia de la masa en adición al efecto que producen las amilasas, pero el efecto de las proteasas no está limitado por la conveniencia de que siempre debe quedar una porción de sustrato sin hidrolizar, como ocurre con el almidón, aunque de igual manera, se observa que una proteólisis demasiado extensa resulta peligrosa.

En cuanto a las lipasas, podemos decir que en condiciones normales su efecto en las masas, resulta despreciable (Pomeranz 1978).

La realización de estudios de la enzima que actúa sobre el almidón en la masa del pan blanco y su comparación con enzimas comerciales de origen fúngico y bacteriano (Valjakka y col. 1994) demuestra que las enzimas bacterianas reducen la velocidad de endurecimiento del pan mientras que las enzimas de origen fúngico y las amilasas propias de la harina disminuyen la dureza inicialmente, pero no afectan la velocidad, es decir, el incremento de la dureza en función del tiempo. En general las amilasas son utilizadas en panadería para aumentar el nivel de fermentación de los azúcares y modificar propiedades físicas de las masas, ambas importantes para mejorar la calidad del pan. Las  $\alpha$ -amilasas bacterianas son muy efectivas para retardar la velocidad de dureza del pan, pero desafortunadamente pueden producir un pan de miga gomosa y pegajosa.

Las alfa-amilasas fúngicas y las de cereales también pueden disminuir la dureza del pan pero no son tan efectivas como las alfa-amilasas de diferentes especies bacterianas (Miller y col. 1953). Sin embargo, en un trabajo reciente Martín y Hoseney (1991) mostraron que las alfa-amilasas fúngicas pueden ser tan efectivas como las alfa-amilasas bacterianas.

Varios estudios muestran que el almidón juega un rol importante en el envejecimiento del pan. Kulp y Ponte (1981) y otros investigadores sugieren que el endurecimiento del pan puede ser causado por una agregación reversible de la amilopectina debida al calentamiento. La amilosa es principalmente retrogradada en el pan caliente, por lo tanto no podría contribuir al endurecimiento durante su estacionamiento.

Martín y Hoseney (1991) y Martín y col. (1991) sugieren que la dureza del pan está relacionada con las interacciones entre el almidón y las proteínas.

Durante el proceso de panificación los gránulos de almidón se hinchan y la amilosa es parcialmente liberada del interior del gránulo. Sin embargo, Inagaki y Seib (1992) muestran que el pan se vuelve duro sin amilosa dentro del gránulo y ellos proponen que durante el proceso de panificación o durante el envejecimiento del mismo, casi siempre ocurren interacciones entre los gránulos hinchados de almidón y la matriz de gluten. Durante el envejecimiento del pan, la amilopectina recristaliza, dando como resultado un aumento en la rigidez del gránulo de almidón y una disminución de la flexibilidad de la matriz de gluten. Todos estos cambios parecen contribuir a la dureza de la miga (Valjakka y col. 1994).

Las preparaciones de alfa-amilasa de cereal actúan muy débilmente sobre el almidón no gelatinizado. A la temperatura de formación de la pasta de almidón solamente las alfa-amilasas bacterianas están totalmente activas, en un valor apreciable a través del tiempo. Las preparaciones de glucoamilasas y amilasas, obtenidas de una especie de *Aspergillus*, también son capaces de hidrolizar el almidón nativo a alta velocidad. Esta mezcla de enzimas (70 % de glucoamilasa y 30 % de alfa-amilasa) produce la hidrólisis total en un período de incubación de 24 horas. Ambas enzimas son necesarias en este caso, pero solamente la glucoamilasa es relativamente termoestable, reteniendo un 90 % de su actividad después de mantenerla 1 hora a 60 °C (Abe y col. 1988 a y b, Bergman y col. 1988).

#### 4.- Absorción de agua

Respecto de la capacidad de absorción de agua, se observa que durante el batido o la obtención de una suspensión de la harina en agua, un aumento de su contenido produce una disminución de la tensión y una falta de cohesión en la masa. En la misma, el agua es absorbida por varios de los componentes de la harina a pesar de que estos difieren ampliamente en sus cantidades. Los cuatro constituyentes principales que contribuyen en la absorción de agua son el almidón nativo, el almidón disponible, las proteínas y los pentosanos, de los cuales el mayor efecto se observa para los pentosanos y el menor para el almidón nativo (Primo Yúfera 1979)

El agua absorbida puede encontrarse ligada o puede aparecer con las características del agua libre. El límite entre una y otra no es muy claro y la distinción depende de la técnica experimental usada. Con resonancia magnética nuclear o por análisis térmico diferencial se concluye que la cantidad de agua ligada es igual a 0,3 del peso de harina seca. Un valor mucho más alto (0,7) se obtiene por extrapolación en medidas farinográficas (Primo Yúfera 1979)

La capacidad de absorción de agua de una harina, también puede ser obtenida por medidas alveográficas (SAG, método experimental de panificación 1952, Pomeranz 1978)

#### 5.- Microflora de las masas

##### 5.1.- El sistema fermentativo

La fermentación tradicional del pan se lleva a cabo por los microorganismos presentes en la harina y por la levadura de panadería, *Saccharomyces cerevisiae*, que se siembra masivamente (Bourgeois y Larpent 1995). La actividad de las enzimas, la formación de CO<sub>2</sub> y su retención dentro de la matriz proteica, son los cambios más importantes que se registran durante este proceso. El volumen de levado y el pH final de la masa, regularán la textura de la miga y el volumen del pan. Aunque la calidad de las materias primas y el curso del amasado (mayor o menor posibilidad de oxidaciones de los compuestos) influyen sobre el desarrollo del aroma y sabor típicos, este dependerá fundamentalmente del proceso fermentativo y de la microflora involucrada (Bourgeois y Larpent 1995).

El sistema fermentativo puede estar compuesto por distintos tipos de mezclas : - microorganismos naturales que bajo condiciones apropiadas, desarrollan espontáneamente, - fermentos o mezclas caseras preparados a partir de masas madres o - fermentos industriales que contienen cultivos de levaduras relativamente puros, prensados o en suspensión (Pederson 1971).

## 5.2.- Datos cualitativos de los microorganismos

### 5.2.1- Las levaduras

Las levaduras son los microorganismos que mayormente originan el hinchamiento de la pasta. Producen la casi totalidad del CO<sub>2</sub> necesario para este hinchamiento, gracias a la gran rapidez en fermentar la glucosa (Bourgeois y Larpent 1995).

En la flora natural presente en los cereales, existen varios géneros de levaduras :

- el género *Saccharomyces*, con las especies más corrientes *S. cerevisiae* y *S. exiguus*. En la literatura a menudo se encuentran los nombres de *S. ellipsoides*, *S. turbidans*, *S. uvarum* y *S. minor*, pero desde el punto de vista taxonómico son variedades de la especie *S. cerevisiae* y difieren solamente en algunas características enzimáticas menores. La especie *S. exiguus* está bastante lejos de la especie *S. cerevisiae* y fué aislada en masas de San Francisco (Kline y Sugihara 1971)
- el género *Candida*, concretamente *C. krusei*, se ha citado frecuentemente en masas de panes de centeno (Spicher y col. 1982) y *C. tropicalis*, aislada por Hardy (1982) a partir de cuatro masas de panes franceses.
- la especie *Torulopsis holmii* (Spicher y col. 1982) está muy próxima al género *Candida*. Algunos taxonomistas incluyen el género *Torulopsis* dentro del género *Candida* (Bourgeois y Larpent 1995).
- el género *Pichia* frecuente en enología ha sido también citado por los mismos autores .

Hay poca información sobre el reparto de los géneros citados anteriormente. Por lo general, *S. cerevisiae* es la especie mayoritaria, hallada como levadura natural . Hardy (1982) encontró que el 80% de las levaduras presentes en las masas de pan francés pertenecía a esta especie.

Por otro lado, *S. cerevisiae* es la levadura que más frecuentemente se agrega para el levado de las masas de harina de trigo (Pederson 1971, Sugihara 1977) . En las masas de centeno se suplementa también con *Candida utilis* con el objeto de aumentar el sabor típico (Pederson 1971).

### 5.2.2.- Las bacterias

El número de géneros de bacterias aisladas en las masas es muy grande. Hay poca información precisa disponible de cada uno de los géneros . Sin embargo se conoce que la mayor parte de las bacterias aisladas son lácticas (Bourgeois y Larpent 1995). En efecto, si bien es posible aislar especies como *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Flavobacterium sp*, *Pseudomonas sp* o *Bacillus sp.*, están presentes en una proporción muy pequeña (Bourgeois y Larpent 1995)

Estas especies se pueden clasificar dentro de la flora no deseable produciendo en algunos casos olores desagradables, sin ninguna relación con los de las masas.

El desarrollo de una de estas cepas puede explicar a veces que una masa sea calificada como no apta para producir el pan (Bourgeois y Larpent 1995)

Las bacterias lácticas pueden pertenecer a numerosos géneros como *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*, este último es el más importante, ya que representa el 80% de las cepas de bacterias aisladas de la masa (Kline y Sugihara 1971, Spicher y col. 1981 y 1982, Bourgeois y Larpent 1995).

Entre las bacterias lácticas se encuentran especies homofermentativas que producen solamente ácido láctico a partir de la glucosa de la harina o de la masa y especies heterofermentativas que producen además ácido láctico, ácido acético y etanol. La principal especie homofermentativa es el *L. plantarum* y las más importantes especies heterofermentativas son *L. brevis* y *L. fermenti* (Bourgeois y Larpent 1995). La distinción entre bacterias homo y heterofermentativas está relacionada con las enzimas propias de estos microorganismos asociadas a la degradación fermentativa de la glucosa y sobre esta base se ha propuesto otra clasificación, en la que se distinguen tres grupos fisiológicos : - heterofermentativos obligados, - homofermentativos obligados y - homofermentativos facultativos (Stamer 1979, Kandler y Weiss 1986). En general, la flora de las masas está compuesta por los tres tipos de cepas. Esto produce un descenso importante del pH y la formación de ácido acético, acetaldehído, CO<sub>2</sub> y otros compuestos, además del ácido láctico, que van incidir sobre las características organolépticas del pan.

La temperatura óptima para el crecimiento de estas bacterias es de 30-35 ° C (Bourgeois y Larpent 1995).

### 5. 3.- Efectos e interacciones de la microflora

La levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, fermenta al mismo tiempo sacarosa, glucosa, fructosa y maltosa. En general, la fermentación con 2 % p/p de levadura produce una disminución del pH de aproximadamente 0,5 unidades o menos, en 3 horas. Sin embargo, un incremento de la acidez puede no tener un efecto marcado, dado que en general son varias y diversas las acciones que afectan las propiedades de la masa : la desaparición de azúcares fermentables, la reducción de la presión de oxígeno, la formación de productos de fermentación, el aumento de volumen o levado de la masa por expansión de las burbujas de gas durante la fermentación, etc. Estos efectos están superpuestos sobre los cambios que se producen en una masa sin levadura (Pomeranz 1978).

En particular el uso de harina de trigo con la adición de extracto de salvado y sucesivos agregados de núcleos de fermentación, que es un método de panificación tradicional español, produce una alta calidad en productos como panes, facturas, etc (Barber y col 1983, Barber y Báguena 1988).

La microflora de las masas con estas características ha sido identificada y evaluada por su actividad fermentativa frente a azúcares en solución (Barber y col. 1985 a, Barber y Báguena 1988). No solamente se aisló *Saccharomy-*

*ces cerevisiae* sino otras levaduras como así también bacterias lácticas de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Las especies puras de estas levaduras y bacterias lácticas han sido usadas como starters en diversos países, con el fin de producir panes de alta calidad. El diseño de starters para la producción industrial en cada tipo de proceso, requiere un conocimiento previo de las características bioquímicas y del potencial para la panificación de los microorganismos que van a ser utilizados, como así también del efecto de su presencia combinada en un mismo sistema.

La interacción entre los microorganismos en las masas de harina de trigo es poco conocida. Dependiendo del tipo, género, especie, cepa y proporción de la microflora presente, es posible encontrar indiferencia, antagonismo, competición o simbiosis entre los microorganismos que utilizan determinados sustratos fermentables. En las masas de pan tipo francés de San Francisco (Kline y Sugihara 1971, Sugihara y col. 1971, Sugihara 1977) se observa que la levadura predominante, *S. exiguus*, no fermenta la maltosa, que solamente es fermentada por *L. sanfrancisco*. En dichas masas particularmente se describe la interacción entre *Candida milleri* y *Lactobacillus sanfrancisco*. Sin embargo, el mismo autor menciona que en la masa de pan tipo panettone italiano la fermentación se debe a la interacción entre *Saccharomyces exiguus* y *Lactobacillus brevis* (Sugihara 1977)

Tampoco la levadura *C. boidinii*, que es un microorganismo importante en las masas con salvado de trigo, fermenta la maltosa. Esto resulta interesante para entender la interacción con otros microorganismos presentes y su efecto en determinadas masas (Barber y Báguena 1988). Además Barber y col. (1989) evaluaron los cambios en los azúcares simples, mono y disacáridos y en los ácidos orgánicos en masas inoculadas con mezclas de *S. cerevisiae* y *C. boidinii* y bacterias lácticas como *L. plantarum* y *Streptococcus sp.*

La microflora de harinas de trigo se relaciona con la carga microbiana inicial del trigo, con el proceso de molienda, con el manipuleo y por último con el almacenamiento de la harina.

En este caso a la microflora propia del cereal, se le agrega la flora contaminante proveniente de los equipos de limpieza, molienda o acondicionamiento, por lo tanto, si las condiciones de trabajo no son las adecuadas la población original puede ser remplazada por otra proveniente de contaminaciones secundarias (Pederson 1971, Mitschele y col. 1978).

En masas preparadas con harina de centeno, la interacción entre bacterias lácticas y levaduras es muy notable (Spicher y col. 1981 y 1982). Los efectos de los microorganismos típicos de este tipo de masas también resultan importantes (Spicher y Nierle 1984 a, 1984 b, 1988; Lonner y col. 1986; Javanainen y Linko 1993). La presencia de levaduras, *S. cerevisiae*, *Pichia satoi*, *Candida kruseei* y *Torulopsis holmii* modifica la actividad fermentativa de las bacterias acidolácticas. Con estas bacterias y a dosis escogidas, puede variar la producción de ácidos acético y láctico, como así también la proporción de isómeros L (+) y D (-). Ambos parámetros, contenido de azúcares y tipo y proporción de ácidos producidos influyen decididamente sobre las características organolépticas del pan (Barber y col. 1989)

Por otro lado, bacterias acidolácticas y levaduras asociadas con la fermentación de la masa ácida de un pan tradicional de Marruecos exhiben una considerable interacción. Los microorganismos aislados están representados por dos especies de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Cándida milleri* y por bacterias lácticas como *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneiri*, *L. casei alactous*, *L. casei casei*, *L. casei rhamnosus* y algunos cocos como *Leuconostoc mesenteroides* y *Pediococcus sp*, muestran que la coexistencia es posible y la interacción entre ambos influye sobre el aroma y la textura de la masa ácida de este tipo de pan, preparado generalmente con fermentos o starters caseros, propios de cada familia, y que en muchos casos se elaboran con harinas de cebada o maíz. Este tipo de pan y otros productos panificados de características semejantes, son ampliamente consumidos en Africa del Norte y en países del Medio Oriente (Boraam y col. 1993, Faid y col. 1993, Faid y col. 1994).

La diferencia entre un pan de masa ácida y un pan industrial, es muy notable. Ello es debido a la interacción natural entre levaduras y bacterias lácticas en el primer caso y a la fermentación debido sólo a levadura en el segundo. En la masa ácida, el gas desarrollado produce una miga de textura más esponjosa y abierta y los ácidos acético y láctico resultantes de la fermentación, aseguran un pH ácido y un ligero sabor ácido en el pan, pero además, puede tener un efecto sobre la extensibilidad de la masa (Boraam y col. 1993).

También el sorgo es empleado para la elaboración de pan en grandes regiones de Africa y Asia. Respecto a este cereal varios estudios realizados en humanos, en animales e in vitro han demostrado que la digestibilidad de sus proteínas es baja (Mohammed y col. 1991). Sin embargo la fermentación previa a la cocción o durante el proceso de formación de la masa, mejora la digestibilidad in vitro e in vivo. Por ello, la producción comercial de Kisra, que es un pan sin levado fabricado en Sudan y regiones vecinas, requiere fermentación previa. Esta se lleva a cabo utilizando microorganismos aislados de la harina de sorgo o starters de cultivos que contienen *Lactobacillus sp*, *Pediococcus sp*, *Enterococcus sp*, etc. y levaduras de los géneros *Cándida*, *Debaryomyces*, etc (Mohammed y col. 1991).

Otro tipo de pan que se obtiene por fermentación con microorganismos naturales, es un pan de Africa occidental, especialmente de Nigeria y zonas adyacentes, denominado pan de cassava, muy característico dado que se produce a partir un tipo de almidón granular, que se extrae de la raíz de la planta y se deja fermentar (Ocafor 1977, Defloor y col. 1993).

Los microorganismos aislados de las masas de producción de estos panes, son principalmente bacterias lácticas tales como *Leuconostoc* y *Lactobacillus sp* y levaduras del género *Cándida* (Ocafor 1977)

También a partir del maíz se pueden obtener dos tipos de alimentos fermentados que se consumen en varios países de Africa. El ogi que se obtiene por fermentación de una suspensión de maíz en agua, presenta las características de un gel y es consumido como producto semisólido o como bebida y el ma-wè que es una masa fermentada, a partir de la cual se obtienen discos cocidos o



tortas blandas envueltas en hojas o panes cocidos con vapor. La microflora típica de estos productos está constituida principalmente por *Lactobacillus sp* y levaduras. El mawè tradicional no presenta una composición uniforme debido a las variaciones de los distintos cultivos de maíz, de las condiciones del proceso de elaboración y/o de los factores ambientales considerados durante fermentación, los cuales afectan la naturaleza y actividad de los microorganismos dominantes y las transformaciones bioquímicas que se desarrollan (Hounhouigan y col 1993)

Existen numerosos trabajos de investigación que relacionan el contenido y tipo de microorganismos de las masas panarias con las propiedades funcionales de las mismas (Barber y col. 1983, Barber y col. 1985 b, Barber y col. 1987a, Barber y Báguena 1988, Barber y col. 1989, Barber y col. 1991). En estas investigaciones se estudian la microflora de las masas madre, utilizadas como fermento o como parte de él, en procesos de panificación típicos de España. Además se analizan los cambios químicos durante la fermentación panaria a nivel de los lípidos (Tortosa y col. 1985 y 1986), de la fracción nitrogenada soluble en agua (Benedito de Barber y col. 1985), de fracciones proteicas como las gliadinas (Benedito de Barber 1986), de azúcares individuales, mono y disacáridos y de ácidos orgánicos (Barber y col. 1985 a y 1989), partiendo de masas madres o de masas elaboradas con cepas puras de microorganismos.

Otro hecho importante que debemos considerar es que las masas agrias o ácidas empleadas como masas madre, proveen una población de levaduras y bacterias específicas y en cantidades que estarán dadas por el porcentaje de inóculo adicionado a la masa panaria. Estos dos factores son los que afectarán la plasticidad de la masa y la calidad final del pan. Por lo tanto, bajo estas condiciones es recomendable que para una harina de trigo con 1 % p/p de cenizas, con alta capacidad de absorción de agua y un mantenimiento de la masa a temperatura moderada, el inóculo de masa madre agregado sea de 7,5- 10 % p/p. Así la acidez disminuye a valores de pH de 3,5-4 y el aroma y sabor del pan son aceptables (Collar Esteve y col. 1994 a y b).

## **OBJETIVO**

## OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar la microflora de masas de panadería preparadas con harina de trigo, en procesos estandarizados de panificación, sin el agregado de masa madre, con adición de levadura y sin levadura y estudiar la incidencia de las características fisiológicas y bioquímicas de los microorganismos sobre las propiedades funcionales de la masa, relacionadas con la calidad panadera.

## OBJETIVOS PARCIALES

- Poner a punto una técnica estandarizada de panificación para las masas preparadas con levadura y sin levadura.
- Aislar e identificar los microorganismos presentes en las harinas y en las masas.
- Evaluar la actividad fermentativa de los microorganismos frente a los azúcares presentes y su capacidad de hidrólisis frente a distintas proteínas, almidón de trigo y lípidos
- Preparar masas de panadería con agregado de cepas puras, empleando los microorganismos aislados en mayor número, en forma independiente y mezclados con levadura.
- Analizar los efectos de los microorganismos en distintas etapas del proceso, determinando su concentración, los cambios de pH y acidez y su capacidad de levado.
- Evaluar la calidad de los panes, midiendo volumen, relación corteza-miga, densidad y atributos sensoriales.

## MATERIALES Y METODOS

## 1.- Harina de trigo

Para desarrollar este trabajo se empleó harina de trigo, de calidad 000, sin aditivos, provista por Molinos Concepción (Mar del Plata). Se utilizaron cuatro partidas diferentes, correspondientes a las cosechas 1991, 1992, 1993 y 1994.

Estas muestras se analizaron determinando contenido de proteínas, humedad y cenizas. Para el análisis de proteínas se emplearon los siguientes materiales :  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , marca Cicarelli,  $\text{SO}_4\text{H}_2$  y  $\text{HCl}$ , marca Merck,  $\text{BO}_3\text{H}_3$ , azul de metileno y rojo de metilo, de Aldrich, calidad ACS, un balón Kjeldahl de 100 ml para la digestión y un equipo macroKjedahl para la destilación.

Para determinar humedad se empleó una estufa marca Dalvo, modelo C.H.R.-200 y para cenizas una mufla, marca Ionomex, tipo MLA-1100, temperatura hasta  $1200^\circ\text{C}$ .

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico.

## 2.- Levadura

Para los ensayos que se realizaron con levadura, se empleó *Saccharomyces cerevisiae*. Se adquirió levadura comercial prensada marca Calza, en paquetes de 250 g y se seleccionó luego de someterla a un ensayo estandarizado de calidad, basado en la capacidad de levado. Este ensayo se realizó incubando a  $28^\circ\text{C}$  en una estufa, marca Dalvo, modelo MCT-4.

## 3.- Ensayos de panificación

Las masas se prepararon procediendo de acuerdo con las etapas establecidas en un ensayo estandarizado de panificación utilizado en nuestro país, normatizado por la Secretaría de Agricultura y Ganadería de la Nación.

Previo a cada ensayo de panificación se realizaron los ensayos alveográficos, utilizando un alveógrafo de Chopin, provisto de una amasadora para 250 g de harina, perteneciente a Molinos Concepción. Mar del Plata.

Para la preparación de las masas se empleó una amasadora marca Hobart de tres velocidades, modelo N-50, origen E.E.U.U.

Los panes se hornearon en una estufa Dalvo, modelo CHR/I-250, a  $235^\circ\text{C}$ , colocando en su interior un recipiente con agua a fin de generar el vapor necesario. Se utilizaron moldes de acero inoxidable de las siguientes medidas : en la parte superior, largo 10,5 cm , ancho 7,0 cm ; en la parte inferior, largo 9,5 cm, ancho 5,5 cm ; altura total 5.5 cm.

#### 4.- Medidas de pH

El pH se midió con un pHmetro marca Parsec, modelo Vega V.

#### 5.- Ensayos microbiológicos

Los ensayos microbiológicos se practicaron sobre muestras de harinas y luego sobre muestras de masas, en determinadas etapas de cada proceso.

Se emplearon medios de cultivo Merck ó Difco, para el aislamiento de los microorganismos, reactivos específicos para microbiología para realizar las pruebas bioquímicas y reactivos y drogas de alta pureza para las reacciones enzimáticas.

Los cultivos se incubaron en una estufa de cultivo, marca Dalvo, modelo MCT-4 y para la investigación de coliformes fecales se utilizó un baño termostático, marca Julabo, modelo U 3, regulable a 44,5 ° C.

#### 6.- Determinación de la calidad de los panes

Para los análisis de calidad de los panes se utilizó un equipo para medir el volumen de pan, denominado volumeter o volumenómetro de fabricación francesa, marca Chopin/Trippette -Renaud. Se determinó la relación corteza-miga por pesada, pesando en una balanza granataria electrónica, marca Mettler, monoplato, sensibilidad 0,01 g, modelo Toledo.

#### 7.- Determinación de la composición química de las harinas

Las muestras de harina se analizaron químicamente, determinando el contenido de proteínas por el método de Kjeldahl (Osborne y Voogt 1982) y la humedad y el contenido de cenizas de acuerdo a los métodos recomendados por la AOAC (1990)

**7.1.- Proteínas :** Para realizar este análisis se utilizaron 250 mg de harina, que se digirieron con 0,25 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ; 7,5 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  y 12,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, en un balón Kjeldahl de 100 ml. El tiempo de digestión fue de aproximadamente una hora y después de obtener el color celeste, se prolongó por 30 minutos más. Para llevar a cabo la destilación, se trasvasó el contenido a un balón de 500 ml, con 150 ml de agua destilada. Se agregaron 30 ml de solución de NaOH preparada según Osborne (Osborne y Voogt 1982), (a 250 ml de agua destilada se le adicionaron 125 g de NaOH ), cerrando el sistema de destilación hermeticamente.

El destilado se recogió en 25 ml de solución de  $H_3BO_3$  al 4 % p/v, utilizando como indicador una mezcla de azul de metileno y rojo de metilo, denominada indicador de Taschiro, preparado según lo descrito por Osborne y Voogt (1982). La titulación se efectuó con HCl 0,02 N, previamente valorado con bórax, en presencia del mismo indicador.

**7.2.- Humedad :** En una placa de Petri provista de tapa, previamente calentada a  $130 \pm 3$  °C, enfriada y pesada, se esparcieron homogéneamente 2 g de muestra. Se realizó el secado a  $130 \pm 3$  °C, 1 hora. Las placas se taparon y se colocaron en desecador hasta su enfriamiento a temperatura ambiente. Se pesó rápidamente y la pérdida de peso se consignó como humedad (AOAC 1990)

**7.3.- Cenizas :** Se pesaron en vidrio de reloj 3-5 g de muestra bien homogeneizada y se trasvasaron a un crisol de porcelana, previamente calcinado, enfriado y pesado. Se incineraron en la mufla a 550 °C, hasta obtener cenizas grisáceas o hasta peso constante. Se enfriaron en desecador hasta temperatura ambiente y se pesaron rápidamente (AOAC 1990).

El CaO reincinerado resultó un buen agente secante para el desecador.

## 8. - Ensayos alveográficos

Se realizaron con alveógrafo de Chopin para  $250 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$  de harina, agregando un volumen de solución de NaCl al 2,5 % p/v determinado por el contenido de humedad de las harinas.

La pasta formada se sometió a presión creciente insuflándole aire. Se obtuvieron diagramas con las datos de tenacidad (P), extensibilidad (L) y trabajo de deformación (W) (SAG, método experimental de panificación 1952, Pomeranz 1978).

A partir de estos resultados se efectuaron los siguientes cálculos requeridos para los ensayos de panificación:

**8.1.- Cálculo de la capacidad de absorción de agua :** Se calculó P de acuerdo a la altura del alveograma y luego, considerando P y el contenido de gluten húmedo, se determinó la absorción de agua en ml, para 100 g de harina, según la Tabla I de la técnica de panificación (SAG, método experimental de panificación 1952).

**8.2.- Determinación del tiempo de amasado :** De acuerdo con los datos de trabajos de deformación calculados ( W en joules ) y en base a la Tabla II del ensayo de panificación (SAG, método experimental de panificación 1952) se obtuvieron los tiempos de amasado, que se dividieron en dos períodos (iguales para números pares y un primer período una unidad mayor que el segundo para números impares )

**8.3.- Fijación de los tiempos de prefermentación y fermentación:** La duración del período de prefermentación se obtuvo de acuerdo con la Tabla III (SAG, método experimental de panificación 1952) y aplicando la siguiente fórmula: 80 minutos, más la cifra dada por el porcentaje de gluten húmedo ("g") y menos del valor "M" que se indica en la tabla III de acuerdo al índice "W", es decir:

$$\text{Tiempo de prefermentación} = 80 + g - M$$

Para valores superiores a 80 minutos, el período se dividió en tres tiempos cada uno de los cuales resultó el 60%, el 25% y el 15% del tiempo total. Para valores inferiores a 80 minutos, el período se dividió en dos tiempos que correspondieron al 66% y al 34% del tiempo total.

Por otro lado el tiempo total de fermentación se calculó de acuerdo al índice "W" y a la Tabla IV de la siguiente forma:

Tiempo de punteo o fermentación final = Para intervalos determinados de W se indican intervalos de tiempo de punteo.

Por ejemplo para un W de 430 - 455, se indica un tiempo de fermentación de 87-90 minutos

## 9.- Prueba de la calidad o fuerza de la levadura

La masa se preparó de acuerdo a la fórmula de "Berlin" (SAG, método experimental de panificación 1952) de la siguiente forma:

Harina .....	280 g
Levadura.....	5 g
Sal.....	5 g
Azúcar .....	7 g
Agua .....	160 ml

Se sometió a dos períodos de amasado de 2 minutos, con un intervalo de 2 minutos de descanso, en la amasadora Hobart y se determinó la capacidad de levado (CRC: Dough Rising Capacity) de acuerdo con lo descrito por Faid y col. (1994), de la siguiente manera:

200g de masa se introdujeron en un vaso de precipitado graduado y se presionaron hasta ocupar un volumen de 160 ml ( $V_i$ ). Luego se colocó el recipiente en estufa a 28 °C, el tiempo necesario, coincidente con el tiempo calculado para la fermentación final, para la harina que se ensayaba (determinado según la Tabla IV del método experimental de panificación (SAG 1952).

El incremento de volumen se midió por lectura directa del valor en el vaso graduado sustrayendo el volumen inicial.



Se trató de utilizar partidas de levaduras que produjeran el mismo incremento de volumen y de no conseguirse, se ajustó la concentración de la misma, en la masa.

## 10.- Ensayos de panificación

De acuerdo con el método experimental de panificación (SAG 1952) los ingredientes utilizados para cada proceso fueron los siguientes :

Harina.....	300, 0 g
Levadura prensada ....	9, 0 g
Azúcar (sacarosa) .....	7, 5 g
Sal fina .....	3, 0 g
Agua .....	tres veces el porcentaje determinado por el valor del índice "P" .

**10.1.- Preparación de la solución sal-azúcar :** Para cada ensayo se emplearon 3 g de sal y 7,5 g de azúcar disueltos en 69,3 ml de agua, por lo que se obtuvo un volumen de 75 ml de solución.

**10.2.- Preparación de la suspensión de levadura :** Se suspendieron 9 g de levadura prensada fresca, previamente estandarizada, en 67,5 ml de agua entibiada a 30° C, con lo que se obtuvo un volumen total de 75 ml. Se preparó una suspensión lo mas homogénea posible.

**10.3.- Amasado :** Se colocaron los 300 g de harina en el bol de la amasadora, se le agregaron los 75 ml de la suspensión de levadura y la cantidad de agua correspondiente de acuerdo con los cálculos de absorción, efectuados a partir de "P, calentada a 30 °C. Al volumen de agua a agregar, se le restó un volumen de 136,8 ml, que es la suma del que se empleó para preparar la suspensión de levadura y la solución de sal-azúcar.

Una vez mezclados estos ingredientes, se agregaron los 75 ml de la solución de sal-azúcar.

El tiempo de amasado, calculado según lo indicado arriba, se dividió en dos períodos, (con valores promedios de 3-4 minutos cada uno), estableciéndose entre ellos un intervalo de descanso de 2 minutos.

**10.4.- Pre-fermentación :** Al término del amasado, la totalidad de la pasta se colocó en un recipiente de plástico inerte, ligeramente engrasado con aceite hidrogenado sólido. Se estacionó para su fermentación en estufa a 30 °C, con humedad regulada con un recipiente con agua, colocado en el interior de la estufa.

Al cumplirse el 66 % del tiempo total y teniendo en cuenta que debían cumplirse dos períodos de pre-fermentación, se efectuaron los "punchs", desalojos de CO<sub>2</sub> de la masa, que fueron hechos a mano en forma suave, apre-

tando y doblando la masa hacia el centro del bollo (SAG, método experimental de panificación 1952). Posteriormente y de acuerdo con los tiempos de prefermentación diagramados, la masa se colocó nuevamente en la cabina de fermentación un 34 % más del tiempo total.

**10.5.- Torno o división de la pasta :** Terminada la operación anterior la pasta se dividió en tres partes iguales, ajustándolas de acuerdo con su peso. Luego se procedió a moldear cada uno de los trozos de masa, de la siguiente manera: Sobre una tabla de madera de 25 x 35 cm, provista de dos listones longitudinales de 8 mm de altura, se alisó o estiró la masa con un rodillo de madera, de forma tal de obtener un disco de 8 mm de espesor. Luego se doblaron los bordes opuestos del disco hasta el centro y se alisó la pasta hasta obtener nuevamente el espesor indicado. Posteriormente se dió vuelta la masa y se repitió la operación anterior. Finalmente se arrolló el rectángulo de masa hasta darle la forma de cilindro con un largo inferior a la longitud del molde.

Los tres cilindros de masa se colocaron en los moldes ligeramente engrasados, con los cierres hacia abajo.

**10.6.- Punteo de la pasta o fermentación final :** Los moldes se llevaron a una estufa de fermentación a 30 ° C y se dejaron fermentar durante el período de tiempo calculado de acuerdo a "W".

**10.7.- Cocción :** Al aproximarse el final del tiempo fijado para la fermentación, de los tres moldes uno se colocó en el horno, dos a cinco minutos antes, el segundo en el tiempo justo y el tercero dos a cinco minutos después de dicho tiempo.

La cocción se efectuó en una estufa regulada a 235 ° C, en presencia de vapor, durante 30 minutos.

**10.8.- Medición del volumen del pan :** Se realizó después de una hora de finalizada la cocción. El volumen se midió por desplazamiento de semillas de colza, realizando las mediciones por triplicado.

## **11.- Ensayos microbiológicos**

En todos los procesos de panificación realizados, se consideró como primer punto de estudio, la microflora de las harinas, dado que el aporte de los demás ingredientes o materias primas no fue significativo.

En la preparación de las masas, se tomaron en cuenta las tres etapas fundamentales del proceso : tiempo inicial (inmediatamente después del amasado), tiempo de prefermentación (calculado para cada proceso, según los datos alveográficos) y tiempo de fermentación final (tomado en el momento de finalizar la fermentación en el molde).

### 11.1.- Toma de muestras

En cada uno de estos tiempos se extrajeron muestras para los ensayos microbiológicos, para la determinación de pH y para la titulación de la acidez.

Para ello las masas se prepararon considerando 60 g en exceso, a fin de contar con 10 g de muestra para el muestreo microbiológico y 10 g para la determinación de pH y acidez, en cada punto de las etapas mencionadas.

### 11.2.- Preparación de las diluciones

Las diluciones se efectuaron a partir de la dilución 1 en 10 preparada con 10 g de muestra, pesada asépticamente, mas 90 ml de solución con buffer de fosfatos pH 7,2 (Butterfield 1932), hasta la dilución  $10^{-3}$ , lo que permitió contar con valores de recuento aceptables (30 a 300 UFC por placa) (ICMSF 1983, Mossel y Moreno García 1985).

### 11.3.- Recuentos y aislamientos

A partir de las diluciones efectuadas se realizaron las siguientes siembras, empleando para cada dilución y para cada recuento, tres placas (ICMSF 1983, Mossel y Moreno García 1985).

#### 11.3.1.- Recuento de bacterias aerobias mesófilas

Se empleó plate count agar, PCA, incubando a 35-37 °C, 48 horas (ICMSF 1983, Mossel y Moreno García 1985).

#### 11.3.2.- Recuento y aislamiento de *Lactobacillus sp*

Se realizaron los recuentos en agar MRS, de acuerdo con De Man, Rogosa y Sharpe (1960), incubando en microaerofilia, empleando anaerocult C (Merck), en jarra de anaerobiosis, a 30 °C, durante 5 días (Gibbs y Skinner 1966, Kandler y Weiss 1986)

Los aislamientos se efectuaron por pasajes sucesivos en este medio y en masas preparadas con *S. cerevisiae* donde el aislamiento se vió dificultado por la presencia de gran cantidad de colonias pertenecientes a esa levadura, se empleó agar SL, medio acetato de Rogosa, Mitchell y Wiseman, regulado a pH 5,4, con el agregado de cicloheximida en concentración de 100 mg /L. (Kandler y Weiss 1986)

Las colonias fueron chequeadas por Gram y reacción de la catalasa. Los bacilos de extremos redondeados, Gram positivos y catalasa negativos, se transfirieron a MRS, se incubaron en las condiciones descriptas, hasta

la obtención de crecimiento visible, se guardaron en heladera y se mantuvieron entre 4-7 ° C, repicándolas cada mes (Kandler y Weiss 1986), hasta la realización de las pruebas bioquímicas.

### 5.3.3.- Recuento y aislamiento de *Micrococcus sp*

Se empleó agar manitol-sal común-rojo de fenol para los recuentos y primeros aislamientos. Se incubó 3 días a 37 ° C. Se seleccionaron las colonias manitol positivas y se repicaron en agar furazolidina (agar Fto) selectivo para *Micrococcus sp*, dado que las bacterias de este género son resistentes a este antibiótico y los *Staphylococcus sp* son fuertemente reprimidos (Schleifer 1986). También se realizó el test de oxidación y/o fermentación de la glucosa, siguiendo la técnica descrita por Baird Parker (1966), método propuesto por el Subcomité Internacional de *Staphylococcus* y *Micrococcus* (1965) con el que se obtuvieron idénticos resultados que con el método de Hugh y Leifson, pero con una producción de ácido en anaerobiosis mucho más rápida (Gibbs y Skinner 1966). En este medio se observa que los micrococos metabolizan la glucosa oxidativamente, es decir, que el O<sub>2</sub> es el último aceptor de electrones, razón por la cual crecen aerobicamente, en cambio los estafilococos pueden crecer aerobicamente y anaerobicamente (Baird Parker, 1966).

Para realizar la prueba se utilizó un medio semisólido con glucosa y púrpura de bromocresol como indicador (Gibbs y Skinner 1966). A partir de las colonias sospechosas se sembraron por punción dos tubos. Uno de ellos se cubrió con vas-par (vaselina-parafina) estéril y ambos se incubaron a 30 ° C una semana.

El viraje al amarillo del indicador debido a la acidificación del medio, sólo en el tubo aerobio, fue evaluado como perteneciente a cepas de metabolismo oxidativo, en cambio el viraje del indicador en ambos tubos, se consideró como propio de cepas con metabolismo fermentativo.

Una vez efectuadas estas pruebas, las cepas se cultivaron en agar P ó agar nutritivo a 30-37 ° C hasta obtener un abundante crecimiento y se mantuvieron en refrigeración (5 ° C) en tubos sellados, hasta la realización de las pruebas bioquímicas, que se efectuaron siempre antes de los tres meses (Bergey's manual 1986)

Inicialmente, como se sospechaba de la presencia numerosa de especies del género *Bacillus*, a estos medios de mantenimiento se les adicionó NaCl al 7 %, a fin de inhibir su crecimiento (Schleifer 1986).

### 11.3.4.- Recuento de coliformes totales

Se efectuó partiendo de la dilución 10<sup>-1</sup>, utilizando como medio de cultivo agar cristal violeta rojo neutro bilis (APHA 1976, ICMSF 1983). Se sembró por vertido en placa con 10 ml de medio de cultivo, se dejó solidificar y se colocó una capa superficial de 5 ml del mismo agar dejando solidificar nuevamente, a fin de producir una ligera anaerobiosis. Se incubó a 35-

37 °C, 24 horas. Las colonias de diámetro mayor de 0,5 mm, de color rojo intenso, algunas con un precipitado blanquecino alrededor, se contaron como positivas. Se realizaron los repiques para las pruebas bioquímicas, de acuerdo con Mc Fadin (1980).

#### 11.3.5.- Investigación de coliformes fecales

A partir de las colonias positivas en el agar cristal violeta rojo neutro bilis, se sembraron tubos conteniendo caldo verde brillante o Mc Conkey, se incubaron a  $44 \pm 0,5$  °C, 24-48 horas. La producción de gas en el primer medio o la observación de ácido y gas en el caldo Mac Conkey, se consideraron positivos. De los tubos positivos se hicieron repiques en agar EMB (eosina-azul de metileno), incubando a 35 °C, 24-48 horas. En este medio se consideraron como positivas las colonias grises verdosas con brillo metálico. A partir de las mismas se realizaron los repiques para las pruebas del IMVyC (indol - rojo de metilo - Voges Proskauer y citrato) (APHA 1976, Mc Fadin 1980, APHA-AWWA-WPCF 1992)

#### 11.3.6.- Recuento y aislamiento de estreptococos

Se empleó el medio recomendado por la ICMSF (1983), agar azida de sodio con agregado de cloruro de 2-3-5 trifeniltetrazolio o medio KF para estreptococos. Las colonias rojas por reducción del TFT, con halo amarillo por acidificación del medio, debían considerarse como pertenecientes al género *Streptococcus* (ICMSF 1983, Mossel y Moreno García 1985).

#### 11.3.7.- Recuento y aislamiento de *Bacillus* sp

Para la investigación de esporulados aerobios, por un lado, suspensiones de las muestras ( correspondientes a diluciones de  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ) se sembraron directamente en caldo nutritivo y en PCA y por otro lado, suspensiones preparadas de la misma manera, se sometieron a una pasteurización, calentando a 80 °C, 10 minutos. Estas también se sembraron en caldo nutritivo y en PCA y todas se incubaron en estufa a 32 °C, 48 horas. Los cultivos positivos provenientes de las muestras sometidas a la pasteurización previa, se repicaron en agar-manitol-yema de huevo-polimixina (MYP), utilizando azul de bromotimol o rojo de fenol como indicador de la utilización del manitol. Se consideraron positivas las placas que presentaban colonias rodeadas o no por un halo transparente y que fermentaron el manitol.

Posteriormente las cepas aisladas se identificaron de acuerdo a características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Fields 1978, ICMSF 1983, Gilbert 1983, Sneath 1986).

### 11.3.8.- Recuento de levaduras y mohos

Se sembraron las diluciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , para las harinas y  $10^{-1}$  para las masas. Los cultivos se efectuaron en agar-extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol (YGC). Las placas se incubaron 5 días a  $24 \pm 2$  °C, examinándose a partir de los dos días de incubación, observando la formación de micelio aéreo. Pasados los 5 días se contaron las colonias de mohos y levaduras preferentemente en las placas que presentaban  $75 \pm 25$  colonias (Mossel y Moreno García 1985). Para calcular el número de unidades propagadoras de mohos y levaduras por gramo de harina o masa se multiplicó el número promedio de colonias por diez veces el factor de dilución, correspondiente a las placas elegidas para el recuento (Kreger-van Rij 1984, Mossel y Moreno García 1985, Alexopoulos y Mims 1985).

### 11.4.- Caracterización

Para la realización de las pruebas de identificación o caracterización de las cepas, de los cultivos positivos se tomaron al azar un número de colonias igual a la raíz cuadrada del número total de colonias de cada tipo (Mossel y Moreno García 1985). Estas se inocularon en los medios para mantenimiento o se repicaron en los medios específicos empleados para las pruebas bioquímicas.

Los ensayos para la determinación de los géneros y especies se practicaron según Bergey's manual of determinative bacteriology (1986).

#### 11.4.1.- Caracterización de *Lactobacillus sp*

Los cultivos se incubaron a 15, 37 y 45 °C en MRS en ligera anaerobiosis (con 5 % de CO<sub>2</sub>). De acuerdo con Niven y col. (1942), Gibbs y Skinner (1966), Stamer 1979, Kandler y Weiss (1986), Fuselli y col. (1994) se consideraron como caracteres de identificación :

11.4.1. a- **Morfología** : Se observaron los cultivos a simple vista y con lupa para establecer el aspecto general que presentaban las colonias. Se tuvieron en cuenta tamaño, bordes, convexidad, brillo, pigmentación, tipo de superficie, etc (Jay 1981). De las colonias obtenidas en las diferentes temperaturas de incubación, se extrajo material y se realizó la coloración de Gram y la prueba de la catalasa.

11.4.1. b.- **Coloración de Gram** : Se efectuó de acuerdo a la técnica de Gram-Koppelof con un equipo de Britania.

11.4.1. c.- **Prueba de la catalasa** : Se escogieron las colonias típicas y se sembraron en caldo cerebro corazón y se incubaron a 35-37 °C durante 18 a 24 horas. Se tomaron asepticamente 3 ml de de cada cultivo y se le agregaron 0,5 ml de

Peróxido de hidrógeno al 3 % p/v (10 volúmenes). Se consideró como positiva la producción de burbujas (ICMSF 1983). Ante reacciones positivas débiles o dudosas, se extrajo material de los cultivos empleando un instrumento no metálico y se suspendió en agua oxigenada de 10 volúmenes, sobre un portaobjetos. Se observó la producción de burbujas al microscopio óptico con el menor aumento.

**11.4.1. d.- Movilidad :** Se detectó en preparados por observación directa al microscopio óptico y sembrando por picadura con ansa recta, un medio específico para movilidad (agar nutritivo blando con menos de 0,5 % p/v de agar) (ICMSF 1983)

**11.4.1. e.- Prueba de la oxidasa :** Se colocó un papel de filtro de 6 cm de lado dentro de una placa de Petri vacía y se agregó en el centro 3 gotas de solución acuosa al 1 % p/v de clorhidrato de tetrametilparafenilendiamina. Se extendió cuidadosamente un ansa del cultivo impregnado de reactivo formando una línea de 3- 6 mm. La aparición de color púrpura oscuro en 5-10 segundos se consideró positivo (ICMSF 1983, Mossel y Moreno García 1985).

**11.4.1. f.-Producción de  $\text{NH}_3$  a partir de la arginina :** Se utilizó caldo de ensayo para arginina dehidrolasa de Moeller (Niven y col. 1942, ICMSF 1983). El medio contiene además de las sustancias de origen proteico, glucosa y púrpura de bromocresol como indicador. Una vez preparado se le agregó monohidrato de L-arginina y se distribuyó en tubos pequeños. El pH se reguló a  $6,7 \pm 0,1$ . También se prepararon tubos control sin arginina. Este ensayo es realizable para aquellos microorganismos que pueden utilizar glucosa con producción de ácido, siendo el primer cambio que se registra. La glucosa es degradada a ácido, llevando el pH a valores inferiores a 5,6 y el indicador vira al amarillo. Las bacterias arginina-dehidrolasa positiva producen un nuevo ascenso del pH debido a la hidrólisis de la arginina y el medio se torna violeta. Tanto el medio de cultivo completo como los tubos control, se sembraron con el cultivo puro. La incubación se realizó hasta 4 días a la temperatura óptima. Durante las primeras 6-8 horas, el medio viró a un color amarillo intenso y si la reacción era positiva se fue tornando violeta. El resultado fué considerado válido siempre que los tubos control permanecieron de color amarillo.

**11.4.1. g.- Fermentación de carbohidratos :** Se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Sharpe y Fryer (Gibbs y Skinner 1966), empleando para la diferenciación los carbohidratos que propone el Bergey's manual (1986). Los repiques se efectuaron a partir de cultivos frescos en crecimiento vigoroso. El medio base recomendado es un caldo MRS, sin glucosa y sin extracto de carne, con un indicador de pH. En este caso se utilizó púrpura de bromocresol al 1 % p/v (Fuselli y col. 1994). El pH final del medio de reguló a 6,4. Los carbohidratos se prepararon en soluciones al 10 % p/v, y se esterilizaron en autoclave a  $115^\circ \text{C}$  (0,5 atmósferas de presión), 10 minutos, a excepción de algunos que se

descomponen por el calor como manosa, xilosa y maltosa que se filtraron por filtros de acetato de celulosa de poro inferior a 0,2  $\mu\text{m}$ .

#### 11.4.2.- Caracterización de *Micrococcus* sp

A partir de los cultivos de mantenimiento de las cepas en agar nutritivo o en agar P (Bergey's Manual 1986) se efectuaron las pruebas características del género *Micrococcus* y se hicieron repiques en caldo cerebro corazón a fin de contar con cultivos abundantes para la realización de las pruebas bioquímicas diferenciales de las especies.

Para la identificación del género se tuvieron en cuenta las siguientes características :

11.4.2. a.- **Morfología de las colonias** : Se tomó en cuenta tamaño, forma, bordes, etc, se observó si eran convexas o planas, si mostraban brillo o eran mate, si presentaban pigmentos blancos-crema, amarillos, rosados, naranjas o rojos o eran colonias sin pigmentación. Estos últimos caracteres se consideraron también para la diferenciación de las especies.

11.4.2. b.- **Observación microscópica** : Se efectuaron coloraciones de Gram a fin de poder establecer si eran Gram positivos y determinar la morfología celular. Se observó si los organismos se disponían en forma de cocos individuales, de a pares, en tétradas, en racimos irregulares o en cadenas.

11.4.2. c.- **Movilidad** : Se empleó la técnica de observación directa, suspendiendo el cultivo con una gota de agua destilada sobre un porta-objetos y además se sembró en un agar blando para movilidad con 0,3 % p/v de agar (ICM-SF 1983)

11.4.2. d.- **Crecimiento en medios selectivos** : Se utilizaron agar manitol salado con distintas concentraciones de NaCl (5, 7 y 10 %), agar furazolidina (FTO), agar P con NaCl, con 7 % de NaCl, medio basal inorgánico, denominado medio BIM B que contiene  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como única fuente de nitrógeno (Schleifer 1986, Fuselli y col. 1994, Surono y Hosono 1994). Este último se empleó para la diferenciación de especies.

11.4.2. e.- **Fermentación anaeróbica de la glucosa** : Como se mencionó en 11.3.3.- se efectuó de acuerdo a lo descrito por Baird Parker (1966)

11.4.2. f.- **Prueba de la oxidasa**: Se testearon cultivos de no más de 24 horas y la prueba se realizó de acuerdo con lo descrito en 11.4.1.e.-

La diferenciación y caracterización de las especies del género *Micrococcus* se efectuó de acuerdo con lo propuesto en el Bergey's manual 1986, utilizando las técnicas descritas por Gibbs y Skinner (1966), Schleifer (1986), Fuselli y col. (1994), Surono y Hosono (1994), Palacios y Trucco (1994) :



**11.4.2. g.- Pigmentación de las colonias :** Esta es la primer característica que se tuvo en cuenta para la diferenciación, dado que la mayoría de las especies producen pigmentos carotenoides y solo algunas son no pigmentadas.

**11.4.2. h.- Formación de ácido a partir de la glucosa y el glicerol aerobicamente :** Se utilizó el mismo medio que se empleó para la formación de ácido a partir de manosa, lactosa y galactosa (Gibbs y Skinner 1966). Se le agregó púrpura de bromocresol como indicador y el pH se reguló a 7,0. Un viraje hacia el amarillo del indicador se consideró positivo.

**11.4.2. i- Hidrólisis de la esculina :** Se empleó un agar nutritivo al que se le adicionó 0,01 % p/v de esculina y 0,05 % p/v de citrato férrico. Se consideró positivo el cultivo que desarrolló un color marrón oscuro, alrededor de la línea de siembra.

**11.4.2. j.- Actividad de la arginina dehidrolasa :** Se demostró empleando la técnica descrita en 11.4.1.f. realizando el ensayo en forma aeróbica, es decir, sin colocar en la superficie la capa de vas-par o parafina estéril.

**11.4.2. k.- Reducción de nitratos a nitritos :** Los cultivos se transfirieron a un agar base con triptona, fosfato disódico y glucosa, suplementado con 0,1 % p/v de  $\text{KNO}_3$  y se incubaron 18-24 horas (ICMSF 1983). Para leer los resultados se añadieron unas gotas de ácido sulfanílico (8 g ‰ en ácido acético 5 N) y unas gotas de  $\alpha$ -naftilamina (5 g ‰ en ácido acético 5 N). La aparición de color rojo o rosa se tomó como reacción positiva.

**11.4.2. l.- Crecimiento a 37 °C y con NaCl al 7,5 % p/v :** Se verificó en agar manita NaCl -rojo de fenol (Merck) que contiene esa concentración de sal y se incubó a esa temperatura.

**11.4.2. m.- Crecimiento en agar con nitrógeno inorgánico :** Se utilizó sobretudo para la diferenciación de *M. luteus* de *M. varians*, dado que el primer microorganismo es capaz de utilizar sales inorgánicas de amonio como única fuente de nitrógeno. El medio contiene además otras sales inorgánicas. La positividad del ensayo se evaluó por la presencia de turbiedad (Palacios y Trucco 1994).

**11.4.2. n.- Utilización del citrato :** Para la realización de este ensayo se empleó el medio de cultivo denominado citrato de Simmons (Mc Fadin 1980, ICMSF 1983) en forma de agar inclinado. Se sembraron los tubos con las cepas y se dejaron sin sembrar tubos control. Se realizó la incubación a 30 ° C una semana. Un cambio de color del verde al azul se consideró reacción positiva.

**5.4.2. o.- Producción de acetoína :** Mediante esta reacción se evaluó la capacidad de los microorganismos de fermentar la glucosa produciendo acetil-metilcarbinol o acetoína. Se usó el medio RM-VP (rojo de metilo-Voges Proskauer)

y de los cultivos de 48 horas, se tomaron alícuotas de 1 ml en tubos estériles. sobre las cuales se practicó la reacción de Voges Proskauer. Se agregaron 0,5 ml de solución alcohólica de  $\alpha$ -naftol al 5 % p/v y luego 0,5 ml de solución acuosa de KOH al 16 % p/v. La reacción ocurre en un medio alcalino fuerte y el KOH (o el NaOH, que también puede usarse) facilitan la oxidación. El  $\alpha$ -naftol actúa como catalizador. Los tubos se agitaron y se leyeron a los 10 minutos. La aparición de un color rojo cereza indicó la presencia de acetoina. En el caso de observar reacciones negativas, se dejó en incubación 4 días más.

**11.4.2. p.- Hidrólisis del tween 80 :** El medio utilizado fue un agar nutritivo base suplementado con  $\text{CaCl}_2$  al 0,01 % p/v. Una vez esterilizado y fundido a unos 40-45 °C se le agregó tween 80 hasta una concentración final de 1 %. Se distribuyó en placas de Petri, se sembró y se incubó a 30-32 °C, 48 horas. Este método se emplea para detectar actividad de lipasas. Las cepas positivas muestran un halo opaco alrededor de las colonias.

**11.4.2. q.- Hidrólisis del almidón :** Se agregó 0,02 % p/v de almidón soluble a un agar nutritivo base sin glucosa. Se esterilizó a 115 °C, 10 minutos. Se distribuyó en cajas de Petri y los cultivos se sembraron por estriado sobre cuadrantes. Posteriormente se incubaron a 35-37° C, 48 horas. Las placas se revelaron con solución de Lugol. Las colonias positivas mostraron un halo transparente a su alrededor, mientras que el resto agar conteniendo almidón sin hidrolizar, se tiñó de un color azul intenso.

**11.4.2. r.- Hidrólisis de la gelatina :** Se empleó agar gelatina de Frazier (Mossel y Moreno García 1985) preparado con 0,4 % p/v de gelatina. Las placas se inocularon por estrías sobre cuadrantes y se incubaron a 32 °C durante 48-72 horas. Para leer los resultados se inundaron con 8-10 ml de una solución clorhídrica de  $\text{HgCl}_2$  al 15 % p/v. La hidrólisis de la gelatina se midió por la aparición de halos de aclaramiento en las proximidades de las líneas de crecimiento.

**11.4.2. s.- Producción de fosfatasa :** A 100 ml de agar nutritivo base, fundido a unos 40-45 °C se le agregó 1 ml de difosfato de fenoltaleína al 1 % p/v, filtrada a través de filtros de acetato de celulosa de poro inferior a 0,2  $\mu\text{m}$ . Los cultivos se sembraron por estrías y se incubaron 3 días a 30 °C). La actividad de la fosfatasa se detectó invirtiendo las cajas de Petri con los cultivos, sobre una placa conteniendo  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Las colonias fosfatasa positivas se tornan rosadas profundo al exponerlas a los vapores de  $\text{NH}_3$  (Gibbs y Skinner 1966).

#### 11.4.3. - Caracterización de *Bacillus* sp

Los métodos para la detección y aislamiento del género *Bacillus* se basan principalmente en la resistencia de sus esporas frente a tratamientos tér-

micos realizados en general a 80 ° C, 10 minutos, por lo que su capacidad de esporular y resistir estos calentamientos, puede considerarse como una de sus principales características.

Para determinar los caracteres diferenciales de este género se realizaron las siguientes experiencias :

**11.4.3. a.- Formación de endosporos :** Se visualizaron mediante la coloración de Shaeffer y Fulton, con verde de malaquita, utilizando safranina como colorante de contraste. Los esporos se observaron de color verde y los bacilos se tiñeron de color rojo.

**11.4.3. b.- Coloración de Gram :** Se procedió como en 11.4.1. b. observándose bacilos Gram positivos.

**11.4.3. c.- Crecimiento aeróbico :** Se observó en el medio de aislamiento agar manitol- yema de huevo- polimixina con azul de bromotimol (MYP)

**11.4.3. d.- Desarrollo en medios básicos sin agregado de factores de crecimiento :** Se cultivó en caldo nutritivo, en agar nutritivo y en agar glucosa (Sneath 1986)

**11.4.3. e.- Prueba de la catalasa :** Una ansada de un cultivo de 48 horas que se obtuvo en un agar nutritivo, se transfirió a un tubo de hemólisis conteniendo 0,5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10 % v/v. Se observó la producción de gas (Sneath 1986)

**11.4.3. f.- Prueba de la oxidasa :** Se realizó igual que en 11.4.1. e. y 11.4.2. f.

**11.4.3. g.- Reacción de Voges Proskauer :** Se inocularon tres tubos conteniendo el medio RM-VP y se testeó la producción de acetyl-methyl-carbinol después de 3, 5 y 7 días de incubación. Para efectuar la reacción y de acuerdo con lo propuesto por Sneath (1986), se mezclaron 3 ml de NaOH al 40 % p/v con el cultivo y se le adicionaron 0,5 -1mg de creatina.

El test se consideró positivo cuando apareció un color rojo entre los 30-60 minutos, manteniendo los tubos de reacción a temperatura ambiente.

**11.4.3. h.- Reducción de nitratos a nitritos :** Se siguió la misma técnica que se aplicó para los Micrococos (11.4.2. k.).

**11.4.3. i.- Producción de ácido de carbohidratos :** Se utilizó agar inclinado preparado con la misma fórmula que el agar glucosado pero remplazando la glucosa por el carbohidrato correspondiente (Sneath 1986). Se observó el crecimiento, la producción de ácido por viraje del indicador y eventualmente la formación de gas por la aparición de burbujas a través del agar o en el agua de condensación o en ambos. Las lecturas se efectuaron entre los 7 y los 14 días de incubación.

11.4.3. j.- **Hidrólisis de gelatina y caseína** : Se prepararon por separado medios nutritivos sólidos conteniendo gelatina y caseína en igual concentración que la indicada para Micrococos en 11.4.2. r. ( 0,4 % p/v). Después de sembrados, se incubaron a 28-30 ° C, 3 a 5 días. Las placas se revelaron con 10 ml de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N saturada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La aparición de zonas claras alrededor del crecimiento contrastando con el precipitado opaco del resto de la placa, se consideró como hidrólisis positiva.

11. 4.3. k.- **Hidrólisis del almidón** : Se sembró en agar almidón (0,2 % p/v de almidón soluble ), se incubó 3- 5 días y luego se reveló con Lugol.

11.4.3. l.-**Hidrólisis de la esculina** : Se procedió como en 11.4.2.i.

11.4.3. m.- **Hidrólisis del tween 80** : Se siguió la técnica descrita en 11.4.2.p.

11.4.3. n.- **Utilización del citrato** : Se empleó citrato de Simmons y se procedió como en 11.4.2.n.

11.4.3. o.- **Crecimiento a pH 5 y 6,8** : Para la observación del crecimiento a pH 5, se inoculó el cultivo en un caldo ácido y para la observación del desarrollo a pH 6,8 se empleó caldo nutritivo, ambos regulados a sus respectivos pHs. Se evaluó la presencia de turbiedad y la formación de película superficial.

11.4.3.p.-**Actividad de lipasa** : Algunas especies de *Bacillus* producen enzimas lipolíticas que se investigan sobre sustratos grasos. En este caso se empleó agar tributirina (Merck). Se preparó el agar base y se le agregó 1 % p/v tributirina. Se incubó a 35 ° C, durante 72 horas. Los cultivos que poseen actividad de lipasas producen un halo transparente alrededor de las colonias o de las líneas de crecimiento, en contraste con el resto del medio que presenta aspecto de emulsión turbia homogénea

#### 11.4.4.- **Caracterización de Coliformes y Coliformes fecales**

Además de las siembras en EMB, se realizaron las pruebas del IMVyC. A partir del caldo de Mc Conkey, desde el caldo verde brillante y/o desde el EMB se efectuaron repiques para los siguientes ensayos :

11.4.4. a.- **Investigación de indol** : Se empleó caldo triptona (Mc Fadin 1980). Se incubó a 35 ° C, 24-48 horas y se investigó la presencia de indol utilizando reactivo de Kovacs (p-dimetil-amino-benzaldehído en HCl concentrado y alcohol amílico). En las reacciones positivas, se observó la presencia de un color rojo cereza debido a la formación de un compuesto de condensación de estructura quinoide.

**11.4.4. b.- Reacción del rojo de metilo :** Se sembró en el medio RM-VP (Mc Fadin 1980), se incubó 48 horas como mínimo a 35 °C. Los microorganismos que dan positiva esta prueba utilizan la glucosa acidificando el medio. La producción de ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico y otros productos no ácidos como etanol, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, ocurre en muchos casos entre las 18-24 horas de incubación, pero el pH debe descender por debajo de 4,4 para observar el color rojo cereza típico. Si aparece un color anaranjado, el pH se encuentra entre 5,5-5,8 (reacción retardada) y si se observa color amarillo el pH es 6 ó mayor que 6, que se considera negativo. En los dos últimos casos, los tubos se dejan en incubación dos o tres días más para asegurar el resultado. Para practicar la reacción, a una alícuota del cultivo ( 2,5 ml) se le agregaron 5 gotas de solución hidroalcohólica de rojo de metilo al 0,2 % p/v.

**11.4.4. c.- Reacción de Voges Proskauer :** La formación de 2-3 butanodiol y la posterior metabolización a acetyl-metil-carbinol o acetoína, como productos intermedios de la oxidación de la glucosa, se detectó en esta reacción por la formación de un compuesto de condensación entre este producto y los grupos guanidinio de la peptona. Se procedió como se indicó en 11.4.2. o. La aparición de color rojo entre 10-15 minutos se consideró positiva.

**11.4.4. d.- Utilización del citrato :** Se repicaron los cultivos en agar inclinado de Simmons, procediendo de acuerdo con lo descrito en los puntos 11.4.2. n. y 11.4.3. n.

#### **11.4.5.- Caracterización de mohos y levaduras**

Se realizó una observación de las colonias sobre el agar YGC considerando tamaño, forma, caracteres del micelio, aspecto en el reverso, etc. Se extrajo material y se efectuó una observación microscópica entre porta y cubreobjetos. Algunas placas se fotografiaron.

## **12.- Preparación de las masas de panadería con especies puras**

Una vez aislados e identificados los microorganismos de mayor predominio y efecto sobre las masas, se desarrollaron procesos de panificación empleando ingredientes estériles, agregando cada una de las cepas solas o mezcladas con levadura y se obtuvieron panes cuyas características se evaluaron comparativamente.

Para las harinas se ensayaron distintos métodos de esterilización a fin de seleccionar el que menos afecte sus componentes, especialmente sus proteínas. La suspensión de levadura se preparó con agua destilada estéril y la solución de azúcar y sal se esterilizó en autoclave a 0,5 atmósferas, es decir, a 115 °C, 10 minutos. Todo el material e instrumental empleado se esterilizó en autoclave o en estufa y cada proceso se desarrolló trabajando en forma aséptica.

## 12.1.- Esterilización de las harinas

### 12.1.1.- Aplicación de calor

Se pesaron 10, 25 y 50 g de harina y se distribuyeron en capa fina, en una superficie de 22 x 34,55 cm ( 380 cm<sup>2</sup>) (ICMSF 1984). Para la primer muestra la capa alcanzó 2-2,5 mm de altura, para los 25 g , 5 mm y para los 50 g alrededor de 8 mm, respectivamente. Las muestras se colocaron en estufa y se esterilizaron a 130 ° C, 15 y 25 minutos (ICMSF 1984). Para verificar la supervivencia de los microorganismos, se sembraron diluciones de las muestras en PCA, incubando 48 horas, a 35 ° C, para determinar microorganismos aerobios mesófilos totales y en YGC, incubando a 25 ° C, 5 días, para el conteo de mohos y levaduras. Se realizaron ensayos de panificación estandarizados. Tanto las siembras y recuentos como los ensayos de panificación y medidas de volumen de pan, se practicaron antes y después del tratamiento.

### 12.1.2.- Esterilización por luz ultravioleta

Se pesaron 10, 25 y 50 g de harina, se colocaron en bandejas de 380 cm<sup>2</sup> de superficie y se expusieron a la luz ultravioleta a una distancia de 20 cm. Se empleó una lámpara marca P.W. Allen and Co, de fabricación inglesa. Tipo A 425, 220-240 volts, provista de las lámparas S/W- G 8 T 5 y TL 8W/08 Se seleccionó la longitud de onda de 254 nm y se expuso a esta luz previamente la bandeja, durante media hora. Las muestras se analizaron microbiológicamente como se indicó anteriormente, se realizaron ensayos de panificación y se midió el volumen de pan. Cada tipo de muestra analizada se colocó en las bandejas y se expuso a la radiación. Se utilizaron tiempos de exposición de 2 horas (ICMSF 1984) pero también se probaron 3, 4 y 5 horas. Nuevamente, las muestras tratadas, se controlaron microbiológicamente y la muestra tratada 5 horas, se sometió a ensayos de panificación.

### 12.1.3.-Utilización de microondas

25 g de harina se distribuyeron en una superficie de 380 cm<sup>2</sup> en capa fina y se colocaron en un horno microondas, marca SMC, modelo E70E-7/E 100 E-8, potencia de salida 800 W y frecuencia de onda 2.450 MHz (origen EE.UU), a las potencias 10 (máxima para este horno), 9 y 7. Las muestras tratadas con la máxima potencia y con potencia 9, se expusieron 3, 5 y 10 minutos y las que se colocaron en el horno a potencia 7, se mantuvieron durante periodos de tiempo de 20, 10, 5 y 3 minutos. Se efectuaron controles microbiológicos y de panificación antes y después del tratamiento.

## 12.2.- Preparación de los microorganismos

### 12.2.1.- Cultivos para la producción de biomásas

Las cepas de levadura se aislaron en YGC y se sembraron en un caldo extracto de malta-glucosa, en un erlenmeyer de 500 ml que contenía 250 ml de medio. Se incubó a 28 ° C, durante 36 horas, en baño de agua, agitando frecuentemente. Los cultivos se centrifugaron a 2000 g durante 15 minutos y la biomasa separada, se mantuvo a 4 °C, utilizándose el mismo día.

Las cepas de lactobacilos se sembraron en caldo MRS en erlenmeyers que contenían 250 ml de medio, partiendo de un cultivo en tubo de 18 horas. Los erlenmeyers se incubaron a 30 ° C, sin aereación, durante 3-4 días. Los cultivos se centrifugaron a 2000 g, durante 20 minutos y la biomasa obtenida se guardó en heladera, a temperaturas de refrigeración hasta su uso, que se realizó dentro de las 24 horas (Faid y col. 1994)

La biomasa de *Bacillus* se preparó de igual manera que la de lactobacilos, pero sembrando en caldo nutritivo, incubando en aerobiosis y a 37 ° C, 24-48 horas, procediendo posteriormente de igual forma.

### 12.2.2.- Concentración de microorganismos

Se determinó la concentración de microorganismos en las biomásas previamente, realizando siembras en medios sólidos específicos y diluciones adecuadas, para cada caso. Se prepararon cultivos nuevos y se emplearon estos datos de concentración como referencia.

### 12.2.3.- Incorporación de los microorganismos a las masas

Las biomásas se resuspendieron en solución fisiológica estéril, de manera de tener una concentración aproximada de  $10^5$  células /g para cada cultivo y se incorporaron a la masa, colocando 1 ml de suspensión cada 100 g de harina. Se determinaron los perfiles de crecimiento de los microorganismos y se midió la evolución del pH y los cambios de acidez en las distintas etapas del proceso y la capacidad de levado para 3 horas de fermentación.

## 13.- Efecto de los microorganismos en las masas

Para realizar este estudio, se registraron los cambios en los recuentos de la microflora, la evolución y selección de algunos microorganismos y la variación del pH y de la acidez total titulable, en las distintas etapas del proceso (en las harinas, después del mezclado y amasado, durante la prefermentación y al finalizar la fermentación en el molde ). Además se evaluaron la

actividad amilolítica, proteolítica y lipolítica de los microorganismos aislados, como así también su capacidad para fermentar los carbohidratos que pueden estar presentes en las masas, verificando la formación de ácido y gas. Para comprobar la actividad hidrolítica, se utilizaron como sustratos almidón de trigo, gelatina, caseína, proteínas del gluten y tributirina.

La extracción de las muestras y los tiempos que se consideraron para la realización de estas pruebas, se tomaron sobre la base de los datos alveográficos aplicados al proceso de panificación, considerando valores promedio, y se efectuaron de acuerdo al siguiente esquema :

Datos de la harina -----	$t_0$	
Mezclado y amasado ( al finalizar el proceso ) -----	$t_i$ .....	10 minutos
66 % ---- ( 46-48 minutos) -----	$t_{pf}$ .....	56-60 minutos
Prefermentación		
34 % ---- ( 23-24 minutos)		
Fermentación final (en el molde) (80 minutos)-----	$t_{ff}$ .....	160-180 minutos

En el tiempo cero ( $t_0$ ) tanto para los recuentos como para las medidas de pH y acidez titulable, se tomaron los datos que se obtuvieron con la muestra de harina de trigo utilizada,  $t_i$  fue el período correspondiente al mezclado y amasado inicial (valores promedios de 10 minutos),  $t_{pf}$  ó tiempo de prefermentación correspondió a 53 minutos, dato acorde a valores promedio obtenidos en el 66 % del tiempo de prefermentación (que normalmente correspondió a datos promedio de 43 minutos, para un tiempo total de prefermentación de 65 minutos ), este período de 53 minutos se extendió a 1 hora, debido a que aún correspondía a valores de prefermentación. Por último, el tiempo de fermentación final ( $t_{ff}$ ), se tomó al transcurrir esta etapa y efectuar el punteo (valores promedio de 79 minutos), resultado que se sumó a los datos anteriores, por lo que se consideró este punto a los 159-160 minutos y se extendió hasta 3 horas.

La capacidad hidrolítica y fermentativa se evaluó a las 3 horas de incubación y a las 24-48 horas (considerando los tiempos necesarios para el crecimiento de los microorganismos).

### 13.1.-Determinación de pH y acidez

Las muestras correspondieron a los tiempos  $t_0$ ,  $t_i$ ,  $t_{pf}$  y  $t_{ff}$ . Primero se preparó un homogenato con agua destilada que se utilizó para medir el pH y a partir de él se obtuvo la suspensión de harina o masa en solución hidroalcohólica, que se empleó para determinar la acidez (Celsi y Copello 1960). Se tomaron 10 g de harina o masa y se le agregaron 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada.



Se mezcló por agitación y se midió el pH. Luego esta suspensión se trasladó a un erlenmeyer de 125 ml y se le adicionó una mezcla de 15 ml de H<sub>2</sub>O destilada y 25 ml de alcohol etílico de 98 ° a fin de obtener una mezcla hidroalcohólica 1: 1. Los erlenmeyers se taparon y se mantuvieron en reposo 24 horas. Para titular, se tomaron alícuotas de 25 ml del sobrenadante, con pipeta de doble aforo y se realizó la titulación con solución de NaOH 0,1 N, usando fenolftaleína como indicador. El NaOH se valoró previamente, en presencia de fenolftaleína, utilizando biftalato de potasio como patrón primario.

### 13.2.- Actividad amilolítica

Debido a que el equipo enzimático amilasas de los microorganismos, actúa preferentemente sobre el almidón cocido (Dettori-Campus y col. 1992) las cepas se testearon inicialmente en un agar base al que se le agregó 1% p/v de almidón, esterilizándolo posteriormente. Después de sembradas, las placas de *Lactobacillus* se incubaron en jarra de anaerobiosis a 30 ° C, 5 días y las de *Micrococcus* y *Bacillus* en aerobiosis, a 35 ° C, 48-72 horas. En todos los casos se dejaron placas si sembrar como testigos. Posteriormente se realizó el revelado con solución de Lugol y se midieron comparativamente los halos de hidrólisis característicos, expresando los resultados por cruces.

A continuación, las cepas que arrojaron resultados positivos manifiestos, se sembraron en un medio líquido en erlenmeyer. Se preparó un medio base, sin agar, y se le agregó 1 % p/v de almidón. Se esterilizó 15 minutos a 121 ° C. Los cultivos para cada ensayo se realizaron en forma independiente sembrando una cepa por vez. Se emplearon 3 erlenmeyers, uno se dejó como control sin sembrar y los otros dos se inocularon con la cepa a estudiar. Uno se evaluó a las 3 horas ( $t_{ff}$ ) y el otro se dejó 24-48 horas o hasta observar turbiedad o crecimiento. La actividad hidrolítica, en este caso, se determinó por extracción y dosaje de azúcares simples reductores y por medida del almidón remanente.

#### 13.2.1.- Extracción de los carbohidratos

Los carbohidratos simples y oligosacáridos se extrajeron con un solvente capaz de solubilizarlos y de frenar la actividad enzimática simultáneamente. Se utilizó alcohol de 80 ° y calentamiento a reflujo. A una suspensión del cultivo de 25 ml, se le agregaron 20 ml de etanol de 80 °. Con un agitador magnético provisto de sistema de calefacción, marca FAC, de Instrumentalia SRL, modelo A.M.C.-20, se calentó a reflujo durante 30 minutos, agitando constantemente. Se centrifugó en centrífuga Sorval tipo RC-5B- Du Pont Instruments y el sobrenadante se colocó en un matraz de 100 ml. Se repitió la extracción, se centrifugó y se reunieron los extractos (Cottenet 1980).

### 13.2.2.- Dosaje de carbohidratos

Se utilizó la técnica de Fehling Causse Bonnans (Celsi y Copello 1960). Los extractos se llevaron a un volumen aproximado de 80 ml con H<sub>2</sub>O destilada, se le agregaron 5 ml de una solución de acetato de plomo al 20 % p/v (para desproteínizar), se agitó, se llevó a volumen y se filtró. Para la determinación de sustancias reductoras, se realizó la titulación frente a 12,5 ml del reactivo de Fehling Causse Bonnans en caliente, tomando como punto final la aparición de un color amarillento que pasó rápidamente a negro por formación de Cu<sub>4</sub> Fe(CN)<sub>6</sub>. El título del reactivo se determinó frente a una solución de glucosa ( 5 g/L), empleando la técnica descripta.

### 13.2.3.- Determinación de almidón remanente con reactivo de Lugol

A partir de los erlenmeyers sembrados e incubados en las condiciones específicas para cada tipo de microorganismo, se tomaron alícuotas de los respectivos cultivos, se filtraron por filtro Millipore de 0,20  $\mu$  de poro y 3 ml del filtrado se enfrentaron con 0,1 ml de reactivo de Lugol. Se utilizó como testigo 3 ml del medio de cultivo filtrado ( sin sembrar ) más 0,1 ml de Lugol y como blanco medio de cultivo filtrado. Se intentó leer la absorbancia a 610 nm pero debido a que el color no se mantenía estable solo se pudo leer el tubo testigo. Se repitió el ensayo empleando una solución de trabajo de iodo (Bianchi 1993) preparada a partir de una solución de iodo 0,1 N (KI : 20 g, I<sub>2</sub>:12,7 g , H<sub>2</sub>O destilada hasta 1 litro) y de una solución al 2 % p/v de NaF. Este último se agregó como inhibidor de la acción enzimática. La solución de trabajo se preparó empleando 1 parte de solución madre de iodo + 9 partes de solución de NaF.

Las absorbancias se leyeron a 610 nm, inmediatamente después de agregar el reactivo de color.

### 13.2.4. - Extracción de amilasas extracelulares

Se aplicó la técnica descripta por Dettori-Campus y col. (1992). Las cepas se sembraron en caldo nutritivo y se incubaron en las condiciones descriptas anteriormente. Los cultivos se centrifugaron a 3000 r.p.m. en tubos cerrados y se dializaron durante una noche. De esta manera se obtuvo la solución de las enzimas. Se utilizó almidón crudo, esterilizado bajo luz ultravioleta y almidón cocido esterilizado en autoclave en presencia de un buffer de pH 7. Para efectuar la reacción 20 mg de almidón más 2-3 ml de buffer de pH 7 (en el caso de tratarse de almidón cocido, esterilizados previamente) más 5 ml de la solución de enzima, más 100  $\mu$ l de tolueno para prevenir el crecimiento microbiano, se mantuvieron a 37 ° C, durante 24 horas (Dettori y Campus y col. 1992). Se practicó la reacción de Fehling Causse Bonnans para determinar la presencia de azúcares reductores.

### 13.2.5.- Determinación de grupos terminales de almidón (cortes de cadena) por oxidación con periodato

Este procedimiento (Hassid y Abraham 1966) se basa en el hecho de que las glucopiranosas terminales pertenecientes a las cadenas de amilopectina y de amilosa, al oxidarse con periodato, sufren una ruptura de la estructura en anillo, con remoción del C<sub>3</sub> de la hexosa y formación de ácido fórmico. En una molécula no degradada de almidón solamente existe un extremo reductor. El otro extremo de la cadena lineal es no reductor y los extremos de las cadenas ramificadas son no reductores. La cantidad de ácido fórmico que se genera en este caso puede considerarse despreciable. Cuando se oxida con NaIO<sub>4</sub> la cadena recta de una amilosa, ambos extremos producen HCOOH. La unidad de glucosa no reductora produce 1 mol de HCOOH y la unidad de glucosa reductora del otro extremo da origen a 2 moles de HCOOH, por lo tanto cada cadena de amilosa producirá 3 moles de HCOOH. Para el caso de la amilopectina cada extremo no reductor correspondiente a una ramificación o a la cadena lineal, originará 1 mol de ácido fórmico y el extremo reductor producirá 2 moles, por lo tanto en este caso, la cantidad de HCOOH formado dependerá de la longitud de la cadena y de las ramificaciones.

**13.2.5.a.- Reactivos :** Solución saturada de metaperiodato de potasio o de sodio (aproximadamente 0,37 M) : 8 g de NaIO<sub>4</sub> se disolvieron en 100 ml de agua destilada ; NaOH 1 M ; HCl 0,5 M ; etilenglicol ; púrpura de bromocresol ; NaOH 0,01 M ; glucosa o sacarosa , para ser utilizadas como control del experimento dado que producen 1 mol de HCOOH por mol.

**13.2.5. b.- Procedimiento :** Para cada microorganismo se emplearon 2 erlenmeyers conteniendo el medio de cultivo con 1 % p/v de almidón, cada erlenmeyer se preparó con 20 ml de medio, por lo tanto, con 0,2 g de almidón, uno se utilizó como blanco y se dejó sin sembrar y el otro se inoculó con la cepa correspondiente . Una vez sembrado, ambos se colocaron en incubación en estufa de cultivo a 37 ° C y se mantuvieron hasta observar el crecimiento del microorganismo. Además se preparó un erlenmeyer control con glucosa en lugar de almidón. Una vez transcurrido el tiempo necesario, todos los erlenmeyers se enfriaron a 3° C y se les agregó 5 ml de solución saturada de NaIO<sub>4</sub>, 0,37 M. Se llevaron a heladera y se mantuvieron a 3 ° C, 30 horas, en la oscuridad. Se determinó si el tiempo de oxidación fue suficiente como para oxidar el control, realizando la titulación de HCOOH en el erlenmeyer con glucosa y luego se valoraron las demás muestras. Para ello, primero se trataron con etilenglicol con la finalidad de destruir el exceso de oxidante, conservándose en la oscuridad 30 minutos más, a temperatura ambiente y luego se titularon con NaOH 0.01 N, libre de CO<sub>2</sub>, en presencia de púrpura de bromocresol como indicador.

**13.2.5. c.- Cálculos :** El volumen gastado x la N del NaOH ( 0,01 ), dan como resultado los milimoles de HCOOH formado a partir de los 200 mg de almidón. Si 162 es el Peso Molecular de la glucosa anhidra, la longitud de la cadena, se puede calcular mediante la siguiente fórmula :

$$\text{Longitud de la cadena promedio} : \frac{200}{(\text{milimoles}) \times 162} =$$

### 13.2.6.- Actividad diastásica en la harina

Se empleó el método propuesto por la AOAC (1990), se utilizó como reactivo de extracción, solución buffer de acetato de sodio, pH 4,6-4,8 (3 ml de H<sub>3</sub>C-COOH y 4,1 g de H<sub>3</sub>C-COONa anhidro, se llevaron a 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada)

**13.2.6. a- Determinación :** Se colocaron 5 g de harina con una cucharadita de arena calcinada en un erlenmeyer de 100-125 ml. Se adicionaron 46 ml del buffer de pH 4,6-4,8 y la mezcla se incubó en baño de agua a 30 ° C, 1 hora, agitando por rotación frecuentemente. Luego se adicionaron 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( 3,58 ± 0.05 N ). Se mezcló rápidamente y se adicionaron 2 ml de solución de Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> al 12 % p/v. Se mezcló nuevamente, luego se dejó en reposo 1-2 minutos y se filtró a través de papel de filtro Whatman N° 4, descartando las 8-10 primeras gotas.

**13.2.6. b.- Valoración de azúcares reductores :** Para valorar los azúcares presentes en el filtrado, también se procedió de acuerdo a las técnicas de la AOAC (1990)

#### 13.2.6. c.- Reactivos :

- Solución buffer de acetato de sodio : 4,1 g de H<sub>3</sub>C-COONa y 4,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 1 litro de solución.
- Solución de tungstato de sodio : al 12 % p/v- Dilución de 12 g de Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> en H<sub>2</sub>O destilada hasta 100 ml.
- Solución alcalina de ferricianuro de potasio 0,1 N : 33 g de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> y 44 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> por litro de solución.
- Solución de sales y ácido acético : 200 ml de ácido acético, 70 g de KCl y 40 g de ZnSO<sub>4</sub> en 1 litro de solución.
- Solución de KI-almidón soluble : 2 g de almidón y 50 g de KI en 100 ml.
- Solución de tiosulfato de sodio 0,1 N : 24,82 g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O y 3,8 g de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O/ litro.

**13.2.6. d.- Procedimiento para azúcares reductores :** Un volumen conocido del filtrado (5 ml) se trató con 10 ml de solución alcalina de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> y se

colocó en baño de agua caliente por 20 minutos, se enfrió bajo chorro de agua fría y se le agregó la solución acética salina ( 25 ml ) Se mezcló por agitación y luego se adicionó 1 ml de la solución KI-almidón. Se tituló con microbureta utilizando la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1 N, hasta desaparición del color azul. La diferencia entre los 10 ml de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  iniciales y el volumen de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastado, corresponde a los ml de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  0,1 N reducidos, que representan la cantidad de azúcar reductor por 10 g de harina, calculados como maltosa, en base a una tabla de conversión.

### 13.3.- Actividad proteolítica

La capacidad de los microorganismos presentes en las masas de producir proteasas, fue evaluada cultivando las cepas aisladas, en medios de cultivo preparados con distintos tipos de proteínas. Se emplearon medios de cultivo sólidos, conteniendo NaCl, lactosa y agar (sin triptona) al que se le adicionaron las respectivas proteínas en una concentración de 1 % p/v. Solamente en el caso de las proteínas del gluten ( gliadinas y gluteninas ), la adición fue de 0,3 % p/v dado que el medio quedaba demasiado turbio. Las proteínas empleadas fueron gelatina, caseína y proteínas del gluten. Los medios se incubaron en las condiciones descritas anteriormente, a excepción del agar que contenía gelatina que se incubó a 22 ° C y las placas se revelaron con solución de  $\text{HgCl}_2$  al 15 % p/v en HCl concentrado.

Se empleó caseína de leche bovina de 90 % de pureza, marca Sigma y gelatina, de uso microbiológico, obtenida por hidrólisis ácida a partir de materias primas de origen animal, marca Merck. Como proteínas del gluten se incorporó al medio descrito harina de gluten, cuyos valores de humedad, proteínas y cenizas, se determinaron con las mismas técnicas que se emplearon para las muestras de harina de trigo (AOAC 1990).

#### 13.3.1.- Medición de la actividad proteolítica

Las cepas que resultaron positivas en el cultivo en placa, se sembraron en medios de cultivo líquidos que contenían los mismos componentes pero sin el agar. Las determinaciones fueron hechas con una modificación del método de Anson (1939). La caseína se incorporó al medio de cultivo que se reguló a pH 7-7,2 con buffer de fosfatos (Butterfield 1932). La incubación se realizó en estufa a 37 ° C, durante 3 horas y durante el tiempo necesario para el crecimiento de cada tipo de microorganismo. La reacción se detuvo por agregado de un volumen de TCA al 10 %, se dejó 30 minutos a temperatura ambiente y el precipitado resultante se separó por centrifugación a 5000 x g a 15 ° C, durante 15 minutos. Se leyó la absorbancia del sobrenadante a 280 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS marca Shimadzu, modelo UV-2101 PC. Se prepararon blancos de reacción igual que las muestras pero no se sembraron. Se les agregó el TCA, se centrifugaron y se leyeron espec-

trofométricamente, en las mismas condiciones que se corrieron los sobrenadantes de los cultivos ( Sarath y col. 1989)

En la zona del ultravioleta cercano (200-400 nm) muchos compuestos bioquímicos muestran fuertes zonas de absorción, debido a la presencia de sistemas en anillo conjugados, tanto aromáticos como heterocíclicos. Los aminoácidos fenilalanina, tirosina, triptofano, etc., absorben en esa región. Por lo tanto la mayor absorción de las proteínas hidrolizadas en 280 nm, se debe a la presencia de estos residuos (Van Holde 1971).

#### 13.4.- Actividad lipolítica

Las cepas aisladas de los géneros *Lactobacillus*, *Micrococcus* y *Bacillus* , se testearon en agar tributirina (Merck), se incubaron en condiciones óptimas para cada género y se observaron macroscópicamente, a fin de detectar halos transparentes, indicadores de lipólisis, alrededor de las colonias o líneas de crecimiento.

#### 13.5.- Pruebas de fermentación de los carbohidratos

Estas pruebas se realizaron en tubo de ensayo empleando un caldo base para cada tipo de microorganismo, sin agregado de carbohidratos, con púrpura de bromocresol como indicador, provisto de campanita de Durham para la observación de la producción de gas. El medio se esterilizó en autoclave y posteriormente, se le adicionó un volumen de la solución del carbohidrato a testear, preparada al 10 % p/v y esterilizada en las condiciones descritas anteriormente. Se emplearon los carbohidratos que pueden encontrarse en las masas, tales como maltosa y glucosa, provenientes de la hidrólisis del almidón, sacarosa, que se agrega a la masa y rafinosa, que se encuentra en pequeñas cantidades en los cereales y en las harinas (Pomeranz 1978, Henry y Saisi, 1989, Langemeier y Rogers 1995). También se testeó fructosa que puede formarse por hidrólisis de sacarosa o rafinosa.

#### 14.- Evaluación de la calidad de los panes

##### 14.1.- Medición de volumen

Para evaluar la calidad de los panes, una de las determinaciones más importantes es la medida de su volumen (Finney 1984, Shogren y Finney 1984, Saiz y col. 1996). Esta determinación se realizó por triplicado. sobre los panes terminados, después de una hora de finalizada la cocción, utilizando el volumenómetro que se describió anteriormente. Para ello, el equipo se calibró previamente con las semillas de colza en 1500 ml, se colocaron los panes y se registraron los incrementos de volumen. Los datos se obtuvieron del promedio de las tres determinaciones.

#### 14.2.- Relación corteza- miga

Se separó la corteza de la miga, se pesaron ambas fracciones y se calculó el porcentaje de cada una de ellas respecto al peso del pan (Barber y col. 1987 b).

#### 14.3.- Densidad

Se midió teniendo en cuenta el volumen y el peso de cada pan (Barber y col. 1987 b).

#### 14.4.- Atributos sensoriales

Con un grupo de catadores no entrenados, se realizó una evaluación global o general, en la que se tuvo en cuenta: aspecto exterior, color de la corteza, color de la miga, textura de la miga (se observó si era pegajosa, compacta, elástica o esponjosa), aromas y sabores (que se consideraron desde débiles hasta olor y sabor intensos a pan) y aceptación global (desde me gusta mucho o me disgusta mucho) (Barber y col 1987 b, Collar Esteve y col. 1994 a).

#### 15- Análisis estadísticos

El tratamiento estadístico de los datos se efectuó con un programa de computación, MicroCal Origin 3.0, mediante el cual se determinaron los promedios, las desviaciones estándar y se realizaron los gráficos.

## RESULTADOS Y DISCUSION



## 1.- Caracterización de las muestras de harinas

Con el objeto de utilizar muestras de harinas con índices de calidad químicos y microbiológicos conocidos y uniformes, se emplearon muestras de la misma procedencia (provenientes del mismo molino y de la misma marca), que se analizaron química y microbiológicamente, descartando aquellas muestras cuyos resultados mostraban una desviación significativa de la media.

En la Tabla I se muestran los resultados de humedad, cenizas y proteínas de las harinas de trigo calidad 000 que se utilizaron para los ensayos de panificación y de la harina de gluten que se empleó como fuente de proteínas de gluten en los ensayos de evaluación de la actividad proteolítica.

En harina de trigo el contenido de humedad varió en un rango de 12,43 a 12,63 g / 100 g, el de cenizas entre 0,573 y 0,610 g/100g y el de proteínas entre 11,90 y 12,10 g/100 g.

En harina de gluten se registraron las siguientes variaciones : humedad de 8,02 a 8,96 g/100 g ; cenizas de 0,672 a 0,820 g/100 g y proteínas de 74,79 g/100 g a 76,40 g/100 g.

Los resultados obtenidos para harina de trigo pueden compararse con los datos hallados por Barber y col. (1985 b), Barber y Báguena (1988), Collar Esteve (1994 a y b), aunque los procesos de panificación aplicados difieren notablemente de los utilizados en nuestro país y en este trabajo.

La producción de pan por proceso mixto es la práctica industrial más utilizada en España. La masa panaria contiene, a la vez, masa madre y levadura prensada comercial. La mayoría de los trabajos muestran datos de masas madre confeccionadas en el laboratorio, masas madre industriales o masas preparadas con starters. De todas maneras las harinas de trigo empleadas para su elaboración muestran datos de composición bastante coincidentes. De acuerdo con la bibliografía mencionada se registran datos de contenido de proteínas de 11,70 a 12,40 % p/p, valores de cenizas de 0,52 a 0,54 % p/p y resultados de humedad que varían entre 13,38 y 13,59 % p/p.

Hansen y Hansen (1994) muestran datos de composición de harinas de trigo que no resultan tan concordantes, debido a que utilizan harina con distinto grado de extracción. La más parecida es la muestra con mayor grado de extracción (75 %), cuyos datos de composición de proteínas, cenizas y humedad son 14,3 ; 0,66 y 13,6 % p/p, respectivamente.

Harinder y Bains (1987) para una harina de 72 % de extracción, muestran datos de proteínas (Nx 5,7) de 10,1 % p/p.

Kulp y col. (1985) estudian masas preparadas con fermentos líquidos y por el método de la esponja, empleando harina de trigo con 11,3 % p/p de proteínas (Nx 5,7), 0,45 % p/p de cenizas y 14 % p/p de humedad.

No fue posible encontrar datos sobre la composición de harina de gluten, aunque se registran distintos trabajos donde el gluten es incorporado a alimentos a base de cereales, para modificar propiedades funcionales, sensoriales y calidad proteica (Buck y col. 1987) o para mejorar la calidad panadera

de las harinas (Saiz y col. 1996). Con respecto a este último trabajo, los datos de composición obtenidos resultan coincidentes con los obtenidos en esta investigación.

TABLA I : Composición química de las harinas

Componentes	Harinas de trigo		Harina de gluten	
	Contenido en % (*)		Contenido en % (*)	
	$\bar{X}$	DS	$\bar{X}$	DS
Humedad	12,50	0,10	8,48	0,46
Cenizas	0,589	0,185	0,744	0,074
Proteínas ( N x 5,7)	12,01	0,10	75,57	0,80

(\*) Valores promedio ( $\bar{X}$ ) y desviación estándar (DS) para humedad y cenizas de 6 determinaciones y para proteínas de 3 determinaciones.

## 2.- Datos microbiológicos de las harinas

Los resultados microbiológicos obtenidos de distintos muestreos de la harina de trigo 000, se resumen en la Tabla II. Se realizaron 7 muestreos. Los valores promedios de los datos, muestran una dispersión regular de los resultados entre una partida y otra. Se consideraron cuatro partidas que correspondieron a cuatro cosechas diferentes. De la partida 1, se tomaron tres muestras, de la partida 2 se extrajo una sola muestra pero se realizaron dos procesos de panificación, la partida 3 se muestreó en dos oportunidades y de la partida 4, se obtuvo una muestra.

Barber y Báguena (1988) muestran datos microbiológicos de masas madre preparadas en el laboratorio y masas madre industriales. La concentración de los microorganismos en general es superior a la hallada en este trabajo pero estos autores no indican valores para las harinas.

Mitschele y col. (1978) en nuestro país, realizaron un estudio comparando valores microbiológicos para el trigo sin acondicionar, para el trigo acondicionado y para harinas calidad 000 y 0000. De 6 muestras de cada tipo de harinas analizadas, obtuvieron datos promedios de 9-43 coliformes totales/g ; menos de 3 coliformes fecales /g y entre 10-120 esporas/g. El recuento de bacterias aerobias mesófilas para ambos tipos de harinas varió entre 2.500- 11.000/g y el recuento de hongos (en UFC/g) entre 70-750.

Por otro lado, los recuentos de hongos no mostraron diferencias de contaminación entre el trigo sin acondicionar y el trigo acondicionado.

Los resultados hallados son bastante coincidentes con los valores recomendados por organismos internacionales como ICMSF (1984) y APHA (1976)

Los resultados que se muestran en la Tabla II, indican valores de recuentos totales de bacterias mesófilas, que en forma aproximada, duplican los datos de recuento total obtenidos para mohos y levaduras. De los distintos tipos de bacterias aisladas se observa un amplio predominio de *Lactobacillus sp*. Los conteos de coliformes fueron en general bajos y además no se pudieron aislar en un número importante de muestras. No se detectó *Streptococcus sp* en ninguna de las harinas analizadas. Se observa la presencia de *Micrococcus sp* con valores de recuento relativamente constantes. Teniendo en cuenta la procedencia, actividad de agua, pH y composición de esta materia prima resultan llamativos los datos relativamente bajos que se observan en los recuentos de bacterias esporuladas aerobias y bastante significativos los que se muestran para los *Lactobacillus sp*.

TABLA II : Contenidos microbiológicos en harinas de trigo ( en UFC/ g )

	Partida 1			Partida 2	Partida 3		Partida 4	$\bar{X}$	DS
	M1	M2	M3	M1-M2	M1	M2	M4		
A	5800	5960	5480	5200	5400	5300	5500	5520	250
B	ND	ND	ND	150	50	40	ND	37	-
C	220	320	220	170	270	170	150	217	56
D	800	1100	900	1200	1300	1400	1300	1143	206
E	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-
F	200	300	250	200	300	340	200	256	54
G	2300	2740	2520	2800	2800	2400	2800	2623	197
H	1200	1500	1300	1400	1350	1200	1200	1308	108

Referencias : A - Recuento de bacterias aerobias mesófilas totales, B - Coliformes totales, C - Micrococos, D - Lactobacilos, E - Estreptococos, F - Bacterias esporuladas aerobias, G - Mohos y levaduras (evaluados conjuntamente), H - Levaduras.

ND : No detectados. (-) : No realizado.

### 1.3.- Aislamiento de mohos

En el presente trabajo, los mohos hallados correspondieron principalmente a hongos del almacenamiento del trigo (ICMSF 1984) y se identificaron por el aspecto de sus colonias y sus características microscópicas como especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. También se detectaron con bastante frecuencia miembros del género *Rhizopus*, que se reconocieron fácilmente por sus esporas negras (Jay 1981).

Normalmente la flora microbiana de la harina, proviene del trigo y este a su vez se contamina a partir del suelo, del medio ambiente o en las fases de recolección o manipulación (Jay 1981)

La evolución de las técnicas de recolección y transformación de los productos agrarios, el transporte del trigo y de las harinas a largas distancias y el escalonamiento del consumo que trae consigo un almacenamiento prolongado, constituyen condiciones, que si no se controlan, son favorables para la multiplicación de microorganismos indeseables, particularmente de mohos (Bourgeois y col.1994)

#### 1.3.1.- Características macroscópicas y microscópicas

##### *Aspergillus sp*

La mayoría de las colonias fueron de color verde amarillento, tanto en el anverso como en el reverso, aunque también se observaron colonias pertenecientes a este género de color pardo o verdoso. En general el micelio presentó aspecto algodonoso y plano o poco levantado en el centro de la colonia.

Microscópicamente presentaron conidióforos no ramificados y no septados. El ápice mostró un ensanchamiento característico, sosteniendo las fiáldes, de donde se observó que nacen las cadenas de conidios. Las hifas se visualizaron como tubos largos septados transversalmente.

##### *Penicillium sp*

Las colonias correspondientes a este género presentaron color verde azulado, rodeadas generalmente de un borde angosto más claro o blanco. La superficie mostró aspecto aplanado, pulverulento o aterciopelado.

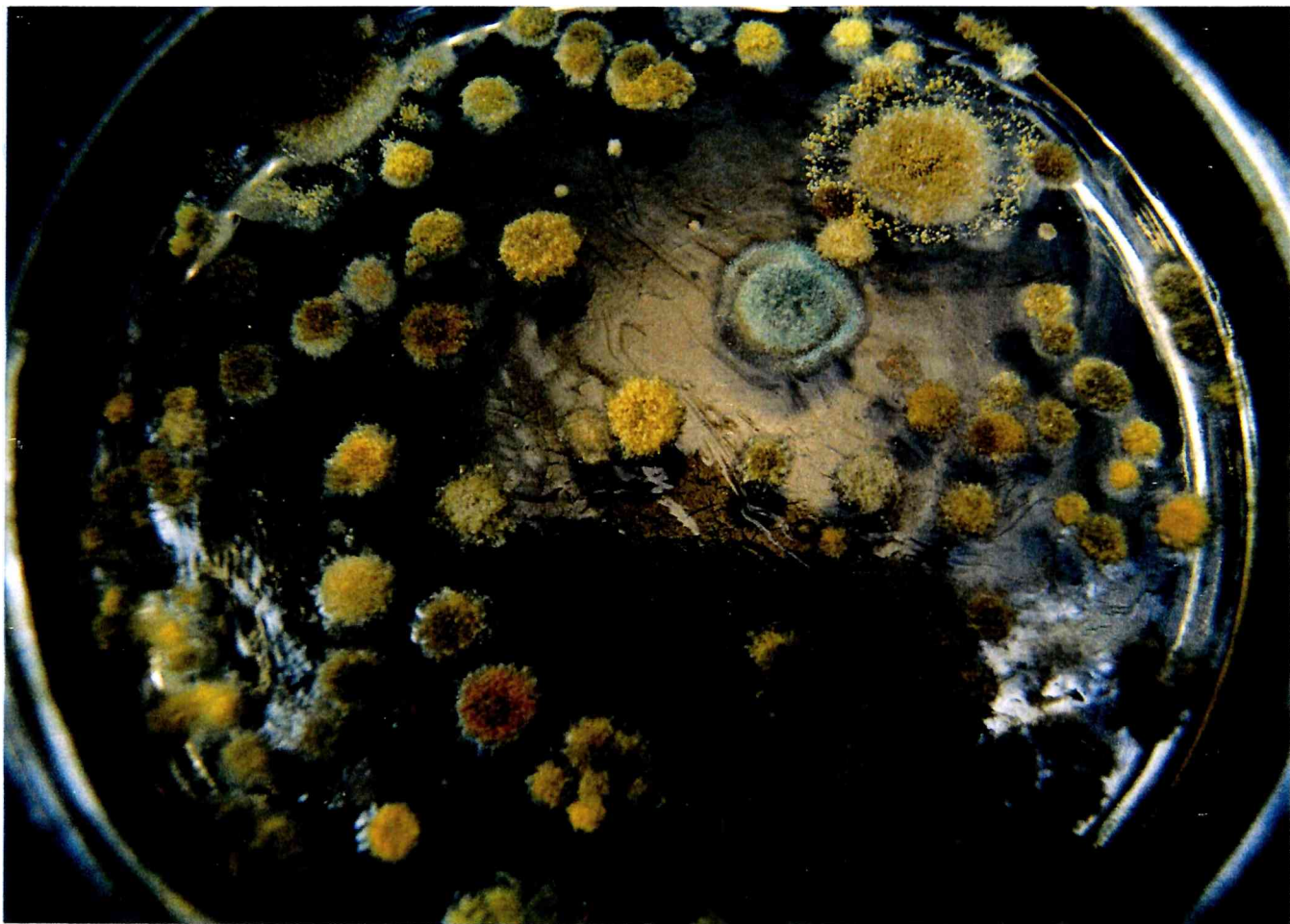
Microscópicamente las hifas aparecieron como tubos del mismo calibre en toda su longitud, provistos de septos transversales. Los conidióforos o esporóforos no presentaron ensanchamiento en el ápice pero se observaron ramificados, con aspecto de pincel. De estas ramificaciones nacen verticilos de esterigmas que sostienen a los conidios.

##### *Rhizopus sp*

Las colonias que se identificaron por sus características como pertenecientes al género *Rhizopus* mostraron un crecimiento rápido y a los 2 ó 3

días se pudo observar un micelio muy algodonoso con pequeños puntos negros que correspondía a los esporangios.

Microscópicamente se observaron hifas de grosor uniforme, desprovistas de septos transversales y manojos de filamentos rígidos, los esporangióforos, que terminaban en un esporangio de color negro brillante. Este esporangio tiene una pared central estéril, la columnela, rodeada de varios cientos de esporas protegidas por una pared, en cuyo interior se mantienen durante su evolución (Bourgeois y col 1994.)



Fotografía 1: Aspecto de las colonias de *Aspergillus*, de color verde amarillento, algunas con el centro más marcado, verde musgo y de *Penicillium*, de color verde azulado, correspondientes a los géneros más frecuentemente hallados en las harinas.

## 2.- Datos alveográficos

Los ensayos de panificación se realizaron con partidas de harinas 2, 3 y 4. Se practicaron cinco ensayos agregando levadura comercial y tres procesos en ausencia de levadura. En todos los casos se efectuaron previamente los análisis alveográficos, cuyos resultados se observan en la Tabla III. También se incluyen los datos de la partida 1, aunque ésta posteriormente no se empleó en procesos de panificación.

Los datos obtenidos en lo que respecta a absorción de agua y trabajo de deformación indican un buen potencial de las harinas para la panificación y son superiores a los hallados por otros autores. Barber y col. (1989) determinaron valores de absorción de agua de 58,2 ml/100 g y datos de trabajo de deformación de (W) de  $221 \times 10^4$  J.

TABLA III : Datos alveográficos de las harinas de las partidas 1, 2, 3 y 4

ALVEOGRAMAS	1	2	3	4	$\bar{X}$	DS
Absorción de agua ( ml/100 g de harina )	59,5	63,5	63	65	63	1,8
Trabajo de deformación $\times 10^4$ (J)	311	362	343	352	352	17
Duración del amasado (minutos)	6	7	7	7	7	0,4
Tiempo de prefer-tación (minutos)	63	65	64	69	65	2,3
66 % del tiempo de fermentación	42	43	42	45	43	1,2
Tiempo de fermen-tamentación final (minutos)	76,5	80	78,5	80,5	79	1,5

$\bar{X}$  : Valores promedio DS : Desviación estándar

De acuerdo con las condiciones que rigen para la técnica de panificación empleada, para un tiempo de amasado promedio de 7 minutos, se establecieron dos períodos de 4 y 3 minutos, entre los cuales se realizó un descanso de 2 minutos. El tiempo de prefermentación promedio fue de 65 minutos y se dividió en dos períodos, el correspondiente al 66 % del tiempo de fermentación y el restante de 22 minutos. También de acuerdo con dicha metodología

la fermentación se llevó a cabo realizando dos levados sucesivos y el punteo o levado final se dió por terminado a los 79-80 minutos, es decir, cuando la línea de contacto de la pasta sobrepasó el borde del molde en su parte central.

### 3.- Microflora de las masas

La microflora de las masas fermentadas con levadura (*S.cerevisiae*) presentan un alto número de unidades formadoras de colonias de esta especie por gramo de masa, acompañado por un complejo de levaduras naturales, algunos mohos y una concentración importante de bacterias, principalmente lácticas (Pederson 1971, Bourgeois y Larpent 1995).

En las masas preparadas sin levadura y sin la adición de bacterias iniciadoras de la fermentación, la microflora está representada por la población de microorganismos que se pueden encontrar en una harina cuando se deja fermentar y se mantiene en buenas condiciones de desarrollo, en cuanto a aporte de agua, temperatura de incubación, etc. (Bourgeois y Larpent 1995).

La fabricación de la masa es un medio eficaz de multiplicación de los microorganismos presentes, ya que se observa un aumento importante de bacterias y levaduras naturales o agregadas, durante el proceso (Bourgeois y Larpent 1995))

Sin embargo es muy revelador comparar datos de la población de levaduras introducidas en la pasta durante un trabajo en directo (al 2 % p/p, es decir, alrededor de  $10^8$  a  $4 \times 10^8$  células de levadura por gramo de pasta), con el crecimiento y la concentración de levaduras de una masa espontánea. La población de levaduras de la primera es por lo menos 10 veces superior a la concentración de estos microorganismos en la segunda. Cuando se panifica a partir de una masa con levadura, se obtiene aproximadamente el equivalente de hasta un gramo de levadura por kilogramo de harina, lo que explica la falta de desarrollo y la lentitud del hinchamiento de masa sin levadura (Bourgeois y Larpent 1995)

En este trabajo y de acuerdo con lo fijado en el proceso de panificación experimental que se siguió, se empleó una concentración de levadura de 3 gramos por cada 100 gramos de harina (SAG, método experimental de panificación 1952)

Barber y col. (1983, 1985 a y b, 1989, 1991) emplean cantidades variables de levadura, siempre inferiores a un gramo, debido a que además adicionan masas madre o starters.

Finney (1984) agrega 2 gramos por cada 100 gramos de harina y Kulp y col. (1985) utilizan para el procedimiento de panificación esponja 2-3 gramos de levadura.

Pomeranz y col. (1984) emplean 4 % p/p de este microorganismo para masas preparadas con harina de trigo, 1% p/p para masas con harina de centeno y 1,9 % p/p para la mezcla de ambas.

Pomeranz (1985 a) muestra la composición de las masas para panes de distintos países, indicando una concentración de levadura adicionada que oscila entre el 1,8 y el 5,5 % p/p.

Podemos entonces concluir, que para distintos tipos de procesos, la cantidad de levadura agregada a las masas varía entre un 2 y 5 % p/p.

El aumento de la dosis de levadura permite acelerar el hinchamiento de la pasta. Así pues para un 2 % p/p de levadura se necesita un 1/3 de tiempo menos para obtener el mismo volumen que para un 1 % p/p de levadura. Con un 4 % p/p de levadura se necesita solamente la mitad del tiempo requerido para un 1 % p/p de levadura. Sin embargo, la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> tiende a disminuir, a dosis muy grandes (Bourgeois y Larpent 1995).

La microflora de las masas, en general, va a depender de las materias primas de las que se parte, de la concentración de levadura agregada y fundamentalmente, del tipo de proceso desarrollado.

### 3.1. - Recuentos microbiológicos

En las tablas IV y V se muestran los valores de los recuentos microbiológicos obtenidos para masas con levadura y sin levadura, respectivamente, para muestras de las partidas 2, 3 y 4.

Se observa bastante variabilidad de los resultados en lo referente a recuentos de bacterias aerobias totales, coliformes y en algunos casos lactobacilos, esto podría deberse a la utilización de harinas de cosechas diferentes. Aunque cabe mencionar que los datos cuantitativos de la flora de masas fermentadas elaboradas con harina de trigo, existentes en la bibliografía (Pederson 1971, Barber y col. 1983, 1987a y 1989, Barber y Báguena 1988, Bourgeois y Larpent 1995), demuestran también una diversidad importante, lo que indica bastante dificultad en conocer la flora de las masas y sus valores de recuento.

TABLA IV: Recuentos microbiológicos de masas preparadas con levadura para distintas partidas de harinas.

#### Proceso realizado con muestras de partida 2 :

	Bacterias aerobias mesófilas totales	Coliformes	Micrococos	Lactobacilos
t <sub>o</sub>	5520 ± 250	37 (**)	217 ± 56	1143 ± 206
t <sub>i</sub> (*)	5600	40	332	1600
t <sub>pf</sub>	9650 ± 1050	30	346 ± 53	2915 ± 285
t <sub>ff</sub>	10950 ± 1550	10	268 ± 28	2925 ± 75

Valores promedio correspondientes a lecturas de 3 placas y dos procesos de panificación  
 (\*) Corresponden a un único proceso. (\*\*) Detectados sólo en algunas muestras.



Proceso realizado con muestras de partida 3 :

	Bacterias aerobias mesófilas totales	Coliformes	Micrococos	Lactobacilos
t <sub>o</sub>	5520 ± 250	37 (*)	217 ± 56	1143 ± 206
t <sub>i</sub>	5950 ± 350	80 ± 60	235 ± 35	1460 ± 60
t <sub>pf</sub>	8300 ± 300	25 ± 15	375 ± 95	2625 ± 125
t <sub>ff</sub>	7750 ± 650	10	468 ± 12	6150 ± 150

Valores promedio correspondientes a lecturas de 3 placas y dos procesos de panificación.  
 (\*) - Detectados sólo en algunas muestras.

Proceso realizado con muestras de partida 4 :

	Bacterias aerobias mesófilas totales	Coliformes	Micrococos	Lactobacilos
t <sub>o</sub>	5520 ± 250	37(*)	217 ± 56	1143 ± 206
t <sub>i</sub>	5700	ND	290	1200
t <sub>pf</sub>	8300	ND	300	4300
t <sub>ff</sub>	8200	ND	430	5800

Valores promedio correspondientes a lecturas de 3 placas en un único proceso de panificación  
 Referencias : ND - No detectados. (\*) - Detectados sólo en algunas muestras

TABLA V : Recuentos microbiológicos en masas preparadas sin levadura para distintas partidas de harina.

Proceso realizado con muestras de partida 2 :

	Bacterias aerobias mesófilas totales	Coliformes	Micrococcos	Lactobacilos	Levaduras
$t_o$	5520 ± 250	37 (*)	217 ± 56	1143 ± 206	1308±108
$t_i$	NR	NR	NR	NR	NR
$t_{pf}$	8600	50	370	10400	1800
$t_{ff}$	14300	ND	290	18400	2800

Valores promedio correspondientes a lecturas de 3 placas en un único proceso de panificación.

Referencias : ND - No detectados. NR - No realizado (\*) - Detectados sólo en algunas muestras

Proceso realizado con muestras de partida 3 :

	Bacterias aerobias mesófilas totales	Coliformes	Micrococcos	Lactobacilos	Levaduras
$t_o$	5520 ± 250	37 (*)	217 ± 56	1143 ± 206	1308±108
$t_i$	7100	40	180	4600	1500
$t_{pf}$	10300	25	370	13000	1700
$t_{ff}$	15600	ND	290	16700	2800

Valores promedio correspondientes a lecturas de 3 placas en un único proceso de panificación.

Referencias : ND - No detectados. (\*) - Detectados sólo en algunas muestras

Proceso realizado con muestras de partida 4 :

	Bacterias aerobias mesófilas totales	Coliformes	Micrococos	Lactobacilos	Levaduras
t <sub>o</sub>	5520 ± 250	37 (*)	217 ± 56	1143 ± 206	1308±108
t <sub>i</sub>	7200	ND	180	14600	1500
t <sub>pf</sub>	12000	ND	370	15800	2000
t <sub>ff</sub>	17000	ND	285	14900	2750

Valores promedio correspondientes a lecturas de 3 placas en un único proceso de panificación.  
 Referencias : ND - No detectados. (\*) - Sólo detectados en algunas muestras

### 3.2.- Evolución de la microflora a lo largo del proceso

Los promedios totales de recuentos, para masas con levadura y sin levadura, se exhiben en las Figuras 1 y 2, y corresponden a los resultados obtenidos en distintas etapas del proceso de panificación, de los cuales no se han encontrado datos publicados. Estos gráficos muestran perfiles microbiológicos para las masas con levadura y sin levadura que indican la misma tendencia, tanto para los recuentos de bacterias aerobias mesófilas totales, como para cada tipo de microorganismo. Teniendo en cuenta que los primeros puntos de estas figuras corresponden a los datos microbiológicos obtenidos con las harinas (valores al tiempo  $t_0$ ), se considera que la formación de la masa se produce a partir del mezclado de los ingredientes y del amasado. Se observa que los recuentos de la mayor parte de los microorganismos asciende ligeramente después del amasado inicial. Esto podría explicarse considerando que la actividad de agua ( $a_w$ ) de la harina y del resto de las materias primas es baja, presentando valores promedio de 0,61-0,85 (Jay 1981). Al preparar la suspensión de levadura y la solución de azúcar-sal e incorporarlas a la harina durante el amasado, se produce un incremento brusco de la  $a_w$ , que no sólo permite el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, sino también el de otras levaduras y microorganismos presentes

En los cereales existen varios tipos de levaduras naturales entre los que se destacan los géneros *Saccharomyces*, con las especies *S.cerevisiae* y *S.exiguus* como las más corrientes, *Cándida* con las especies *C. krussei*, aislada de masas con harina de centeno (Spicher y col. 1981 y 1982) y *C. tropicalis*, citada por Hardy (1982) en su estudio sobre cuatro masas de pan francés. También se han identificado levaduras del género *Torulopsis* (*T.holmii*) y algunas especies del género *Pichia*. Sin embargo, debido a que la  $a_w$  en los cereales y harinas está muy por debajo de 0,87, se observa que el crecimiento de estos microorganismos se encuentra bastante limitado, incrementándose cuando tales productos se mezclan con agua o se preparan las masas. Lógicamente en esta etapa, sólo se detecta un ligero incremento de los recuentos, debido a que el tiempo de contacto es muy corto.

Las bacterias presentan un comportamiento similar. En principio debemos considerar que el aumento de la  $a_w$ , afecta positivamente el crecimiento bacteriano; la mayor parte de las bacterias tiene un desarrollo óptimo alrededor de 0,990 a 0,995, presentando para valores más bajos, una tasa de multiplicación menor y en algunos casos nula. Cuando esto último sucede, las bacterias que se ven más afectadas son los bacilos Gram negativos, cuyo lugar es ocupado progresivamente por cocos o lactobacilos que toleran mejor las condiciones ambientales adversas, representadas en este caso por la menor actividad de agua (Mossel y Moreno García 1985). Esto señala una coincidencia con los resultados que se obtuvieron para las harinas, que muestran una flora bacteriana predominante constituida por *Lactobacillus sp* y por *Micrococcus sp*. Las harinas pueden contener distinto tipo de bacterias Gram negativas, siempre en número escaso. Las más comunes están representadas por *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Flavobacterium*

*sp*, *Pseudomonas sp*, etc. (Bourgeois y Larpent 1995).

En este trabajo se consideraron a los coliformes totales como los microorganismos más representativos de las bacterias Gram negativas. Para el caso de las harinas, se estimaron como datos de recuento inicial, valores aproximados de 37 UFC/g, dado que no se detectaron en un gran número de muestras o se obtuvieron recuentos muy bajos. Para este grupo de microorganismos cabe destacar que la condición de baja  $a_w$  de las harinas, determina una disminución muy notable en la tasa de crecimiento o una inhibición total de su desarrollo, que se revierte en algunos casos, al suspender en agua los ingredientes y amasar la mezcla. Además, se advierte que en masas con levadura, en el período de tiempo correspondiente al amasado, los datos de estos microorganismos muestran una dispersión considerable y dan en algunas muestras datos mayores y en otras menores a los obtenidos en las muestras de harinas. En general los valores promedio muestran una tendencia a disminuir, que se refleja también en las otras etapas del proceso, sobretodo cuando la fermentación avanza y el crecimiento de lactobacilos se hace más notable. En las masas sin levadura, en cambio, en el amasado los valores de coliformes se mantienen bastante constantes, reflejan una tendencia a disminuir en la pre fermentación y desaparecen en la fermentación final. Estas curvas características de las bacterias Gram negativas no se observa para las otras bacterias presentes en la masa, debido a que fisiológicamente ellas toleran mejor la  $a_w$  propia de las harinas e inicialmente presentan valores de recuento más altos.

Otra observación que cabe considerar, tiene relación con la velocidad de crecimiento de los microorganismos cuando asciende la  $a_w$  a 0,98 o más. En general, en estas condiciones, pueden crecer casi todos los microorganismos, pero las bacterias, lo hacen con una velocidad mayor, siguiéndole en orden de velocidad de crecimiento, las levaduras y por último los mohos (Mossel y Moreno García 1985, Bourgeois y col. 1994, Bourgeois y Larpent 1995). Este hecho también condiciona la selección de la microflora y el predominio de determinados microorganismos al finalizar el proceso.

En relación a la velocidad de crecimiento, los resultados muestran que tanto para masas con levadura como para masas sin levadura, el crecimiento de los lactobacilos ocurre principalmente entre los 0-60 minutos.

En las masas sin levadura agregada, se pudo observar el desarrollo de levaduras naturales o propias de la harina. La curva indica una velocidad de crecimiento que mantiene su concentración relativamente constante a través del tiempo. De acuerdo con Bourgeois y Larpent (1995) esta diferencia podría tener relación con el tamaño de las células. Las levaduras por gramo de masa resultan menos numerosas porque ocupan mayor volumen. El volumen de una célula bacteriana es del orden de  $1\mu\text{m}^3$  a  $10\mu\text{m}^3$  mientras que el de una célula de una levadura es del orden de 30 a  $100\mu\text{m}^3$ .

También se observa que en las masas sin levadura, el crecimiento de lactobacilos ocurre más rápido y su concentración alcanza valores más altos a los 60 y a los 180 minutos.

Con respecto al tercer punto de las Figuras 1 y 2, correspondiente a la pre fermentación, debe tenerse en cuenta que en esta etapa, las masas se colocan en la estufa y se mantienen a  $37^\circ\text{C}$ . Esto significa que la mayoría de los microrga-

nismos se llevan a su condición de temperatura de crecimiento óptima, lo que produce un incremento en los valores de recuento, que se observa tanto para las bacterias aerobias mesofílicas totales, como para los lactobacilos. Cabe mencionar, que no existe una correlación directa entre el crecimiento de las bacterias aerobias mesófilas totales, que se cultivan en aerobiosis, a 37 ° C y a pH 7-7,2 y el desarrollo de los lactobacilos, dado que estos cuando se cultivan se llevan a sus condiciones óptimas de crecimiento, en lo referente a componentes del medio, temperatura de crecimiento, condiciones de pH y microaerofilia. Sin embargo, ambas curvas de crecimiento muestran una tendencia a aumentar, mucho más notable para los lactobacilos, lo que indicaría una gran capacidad de adaptación de éstos, a las condiciones fisico-químicas de la pasta (sustrato nutritivo complejo y bastante rico en vitaminas y sales minerales, ambiente anaeróbico o microaerófilo y condiciones de temperatura adecuadas).

Respecto al último punto de la curva, correspondiente a la fermentación final, debe considerarse que en esta etapa, las masas son mantenidas a 37 ° C en el molde, y que las muestras se tomaron a los 180 minutos de iniciado el proceso. Los resultados indican un aumento significativo de la microflora propia de las masas, sustentado sobre la base de un marcado enriquecimiento de la flora natural de las harinas, pero acompañado además, de una selección de los microorganismos, determinada por las condiciones del proceso.

En las masas con levadura (Figura 1) no pudieron leerse los valores de recuentos de levaduras naturales, debido a que las colonias de *Saccharomyces cerevisiae* ocupaban toda la placa.

En ningún caso, pudo aislarse *Streptococcus sp* y los conteos de mohos y *Bacillus sp* fueron poco significativos tendiendo a desaparecer en la fermentación final, razón por la cual estos valores no se muestran.

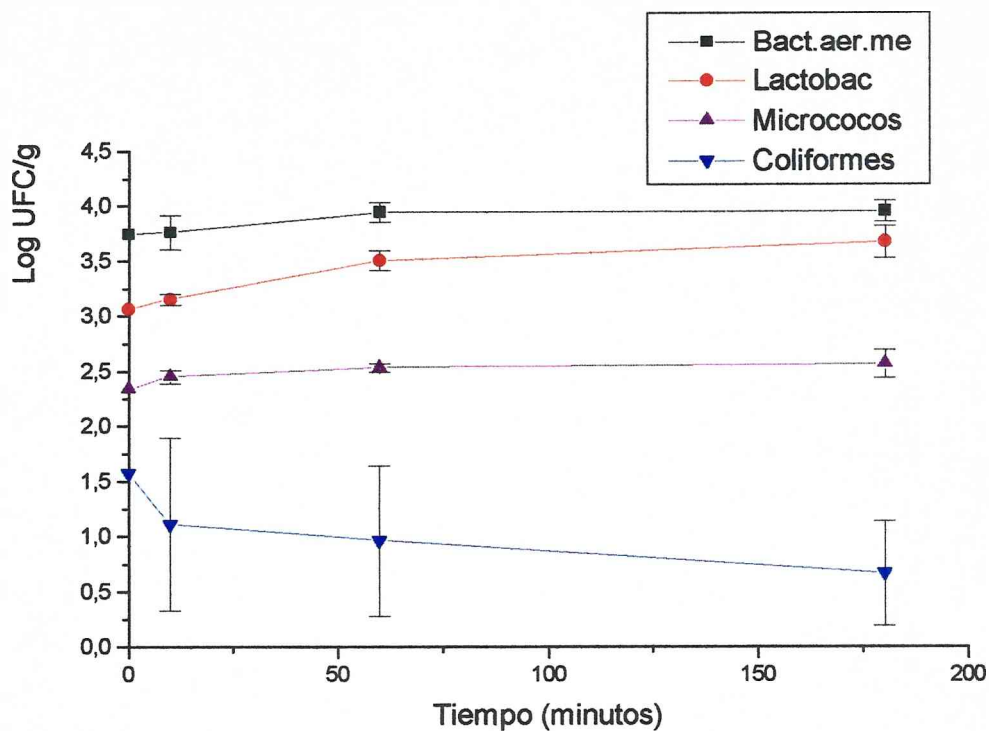


FIGURA 1: Masas con levadura - Valores promedio para cinco determinaciones

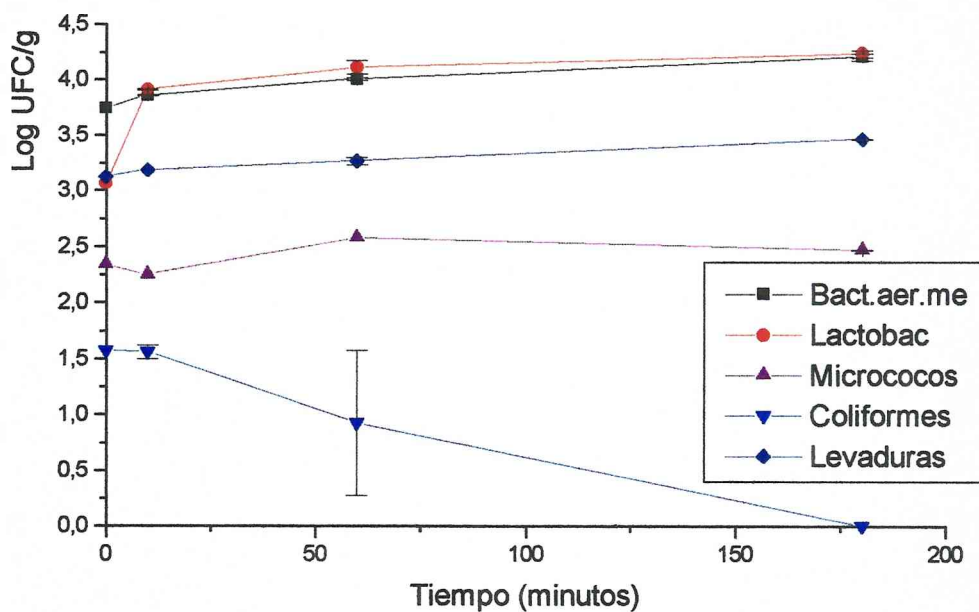


FIGURA 2: Masas sin levadura - Valores promedio para tres determinaciones

### 3.3.- Caracterización de los microorganismos

En las Tablas VI y VII se indican los resultados que se obtuvieron en las reacciones de caracterización de los géneros y especies de los microorganismos más predominantes en las masas. La Tabla VI muestra las características del género y de las especies de *Lactobacillus* aisladas. Del total de bacterias ácido-lácticas se tomaron 50 colonias típicas de *Lactobacillus*. Algunos de estos aislamientos se efectuaron a partir de masas con levadura y otros a partir de la pasta sin levadura. El mayor número de colonias se obtuvo de las etapas de prefermentación o de la fermentación en el molde.

Del número total de colonias aisladas, se identificaron las siguientes especies y proporciones *L.plantarum var.plantarum* 40 %, *L.brevis* 35 %, *L.casei subespecie casei* 6 % y *L.confusus* 2 %.

Las especies *L. plantarum* y *L. brevis* son las más frecuentemente halladas en masas de panadería. Hardy (1982), de 100 cepas de bacterias lácticas aisladas de cuatro masas de pan tipo francés, encontró que un 77 % correspondió a *Lactobacillus* y de estos obtuvo : *L.plantarum* 39 %, *L.brevis* 24 %, *L. casei* 8%, *L.fermenti* 5 % y *L.delbrueckii* 1 %. Los trabajos de Spicher y col. (1981 y 1982), en masas de centeno dieron resultados muy similares con tres especies que predominaron cuantitativamente: *L.plantarum* (33 %), *L.brevis* (25 %) y *L.fermenti* (10 %). Barber y Báguena (1988) aislaron de las masas madre preparadas en el laboratorio, *L.brevis* 44 %, *L.cellobiosus* 17 % y *L.plantarum* 6,25 %. También fueron las especies más abundantes en las masas madre del panettone italiano (Galli y Ottogalli, 1973), del pan de Sangak (Azar y col. 1977), del pan de Marruecos (Boraam y col. 1993), del mawè, masa fermentada del maíz (Hounhougan y col. 1993).

La especie *L.casei casei* se identificó en muy pocos aislamientos y de acuerdo con la bibliografía consultada, pudo constatar que sólo fue aislada por Hardy (1982) y por Boram y col. (1993).

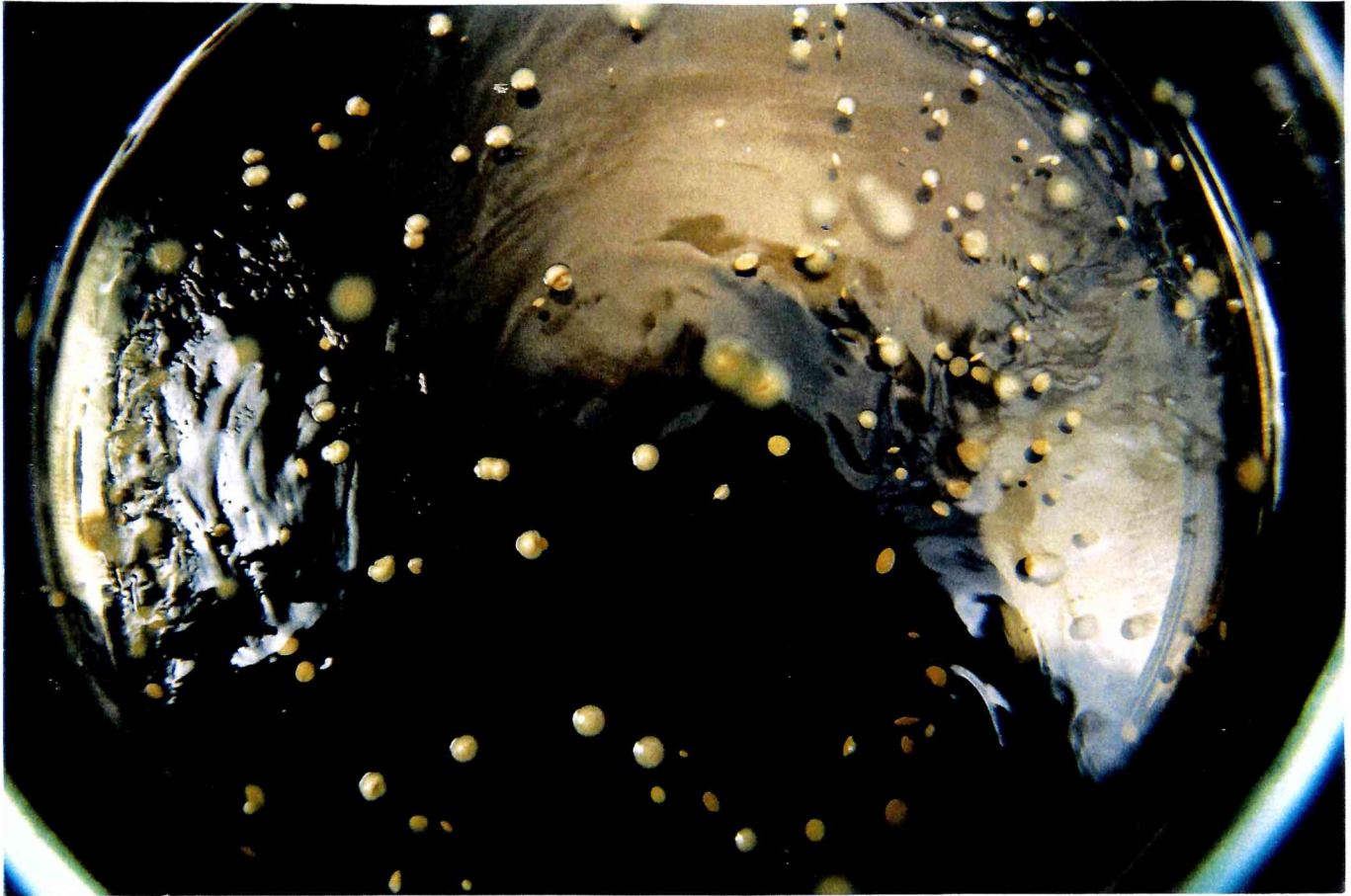
Una sola colonia respondió a las características de *L.confusus*, esta especie también ha sido identificada en el pan de sorgo con 24 horas de fermentación, por Mohammed y col. (1991)

El resto de las colonias, que habían mostrado una morfología con características semejantes a las que presentaban los lactobacilos, tinción de Gram positiva y prueba de la catalasa negativa, no respondieron a las pruebas bioquímicas con resultados típicos.

De un total de 10 colonias de *Micrococcus* aisladas, 4 se identificaron como *M.luteus*. Esta especie también fue hallada por Barber y Báguena (1988) en las masas madre utilizadas en procesos de panificación de España (método esponja) y en masas madres preparadas en el laboratorio. También se identificaron *M.lylæ* (30%) y *M.kristinae* (20 %). Cabe destacar que respecto a estos últimos hallazgos, no se han podido detectar en los datos bibliográficos existentes, resultados similares. También se observan diferencias, en lo referente a otros cocos Gram positivos tales como *Streptococcus sp*, por ejemplo en las masas madre de España, se obtuvieron recuentos de estreptococos del orden de 4 x



$10^4$  células/g y valores más elevados cuando se les agregó salvado de trigo, en cambio, en masas agrias de trigo (El-Tamini,1975) y de centeno (Spicher y col. 1981 y 1982), se encontraron en muy baja proporción.



Fotografía 2 : Colonias redondas, color blanco crema y otras de forma lenticular, a veces incrustadas en el medio, típicas de *Lactobacillus* en agar MRS.

TABLA VI : Características de género y especies de *Lactobacillus* sp

Características	A	B	C	D	E	F
Morfología	Bac Cort	bacilos larg	bac. larg	bac.med	bac. med	Bac. cort
Movilidad	-	-	-	-	-	-
Col. de Gram	+	+	+	+	+	+
Crec.en anaerob:						
en MRS a 15 °C	+	+	+	+	+	+
en MRS a 37 °C	+	+	+	+	+	+
en MRS a 45 °C	-	-	-	-	-	-
Crec. en MRS con CINA 6.5%	+	+	+	+	+	+
Act. de Catalasa	-	-	-	-	-	-
Pba Oxidasa	-	-	-	-	-	-
Hid. de arginina	+	-	-	-	+	+
Red. de Nitratos	-	-	-	-	-	-
Hid. del Almidón	+	+	+	+	+	+
Utilización de:						
Amigdalina	-	+	+	-	+	-
Arabinosa	+	d	d	+	-	+
Esculina	-	+	+	-	+	-
Galactosa	-	+	+	+	+	-
Manosa	-	+	+	+	+	-
Melibiosa	+	+	+	-	-	+
Lactosa	-	+	+	-	-	-
Cellobiosa	-	+	+	-	+	-
Salicina	-	+	+	+	+	-
Sorbitol	-	-	-	+	-	-
Trehalosa	-	+	+	+	-	-
Xylosa	-	-	-	-	+	-
Manitol	-	+	+	+	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	d	+	+	+	+	d
Ramnosa	-	-	-	-	-	-

## Referencias:

A y B : Cepas aisladas de masas con levadura

C, D, E y F : Cepas aisladas de masas sin levadura

+ : Positivo

- : Negativo

d : Dudoso

A : *L. brevis* ; B : *L. plantarum* var. *plantarum* ; C : *L. plantarum* var. *plantarum* ; D : *L. ca*  
D : *L. casei* subsp. *casei* ; E : *L. confusus* ; F : *L. brevis*.

TABLA VII : Características del género y especies de *Micrococcus* sp.

Características	A	B	C	D
Crec. en aerobiosis a 35 °C	+	+	+	+
Col. Gram	+	+	+	+
Disposición	en tetr	en tetr.	en tetr.	en tetr
Colonias	red ext	conv. lis.	red. lis.	redond.
Pigmentac.	naranja pál.	amarilla	blanco crema	blanco crema
Cápsula	-	-	-	-
Movilidad	-	-	-	-
Crec. agar Furazolidina	+	+	+	+
Ferm. aerob. de Glucosa	-	+	-	-
Ferm. anaer. de Glucosa	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	-
Catalasa	ND	ND	ND	ND
Hid.de esculina	+	-	-	-
Hid.de arginina	-	-	-	-
Red. de Nitratos	-	-	-	-
Crec. NaCl al 7.5 %	+	+	+	+
Crec. NaCl al 10 %	+	-	d	d
Crec. en agar Citrato Simmons	-	-	-	-
Hid.de tween 80	-	-	-	-
Hid.de almidon	-	-	-	-
Prod.acetoína	+	-	-	-
Fermentación:				
Manosa	+	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-
Galactosa	-	-	-	-
Fosfatasa	-	-	-	-
Crec. en medio con N inorgánico	-	+	-	-

A : *M. kristinae*      B : *M. luteus*      C : *M. lylae*      D : no específico

Referencias :

positivo : +      negativo : -      dudoso : d      No detectado : ND

en tetr: en tetradas      red ext : redondas extendidas

conv. lis : convexas lisas      red. lis. : redondas lisas

redond : redondas.      naranja pál. : naranja pálido

En la Tabla VIII se muestran las características de las dos especies de *Bacillus* aisladas de las harinas. En las masas, se obtuvieron resultados negativos o poco significativos (1 ó 2 colonias por placa), razón por la cual estos recuentos no se tuvieron en cuenta. Los cultivos obtenidos de las harinas mostraron en caldo nutritivo crecimiento aeróbico y formación de una película de pigmentación marrón. La hidrólisis de la esculina dió resultados positivos, por lo que se orientaron las pruebas hacia la búsqueda de cuatro especies que cumplen con esta condición (*B.subtilis*, *B.cereus*, *B.coagulans* y *B.megaterium*). La ausencia de lipasas, el crecimiento en medios básicos con glucosa y sales de amonio (sin vitaminas ni otros factores de crecimiento) y la imposibilidad de desarrollar a pH 5, indicaron la presencia de *B.subtilis* y *B.megaterium*. Las pruebas diferenciales de ambas especies se muestran en la Tabla IX. En agar polimixina-yema de huevo-manita se obtuvieron colonias rugosas color rosado, lecitinasa positiva, para *B.subtilis* y negativa para *B.megaterium*.

La ausencia de estos microorganismos en las masas podría deberse a su dificultad para crecer en medios de pH 5 o menores.

De acuerdo con los datos bibliográficos disponibles, tampoco se han detectado *Bacillus sp* en otras masas de panadería. Bourgeois y Larpent (1995) sostienen que si bien es posible aislar ciertas especies de estos microorganismos en algunas masas, ellos están presentes en una proporción muy baja.

Si estos microorganismos desarrollan en las masas, se produce un tipo de alteración que se denomina "viscosidad" que se debe fundamentalmente al crecimiento de determinadas cepas de *Bacillus subtilis*, conocido también como *B. mesentericus*. La viscosidad se manifiesta con estructura filamentososa y se puede observar rompiendo cuidadosamente un lote de pasta en dos partes.

Los microorganismos provienen de la harina y crecen cuando la masa no alcanza un pH demasiado bajo y se mantiene a temperatura adecuada un período de tiempo suficiente (Jay 1981). Esta alteración se produce en muchas ocasiones cuando se prepara masa para el pan casero.

TABLA VIII : Características del género Bacillus

Características	
Col. de Gram	+
Movilidad	+
Formación endosporas	+
Forma esporas	red elong
Crec. aerob.	+
Crec. anaerob.	±
Req.f.de crec.	±
Pba de la catalasa	+
Pba de la oxidasa	±
Lecitinasa	±
Red. de Nitratos	±
Red. de Sulfatos	-

Referencias :

positivo : +

negativo : -

variable : ±

red: redondos

elong : elon-  
gados

TABLA IX : Características de las especies de Bacillus

	A	B
Hid.de la esculina	+	+
Pba de la catalasa	+	+
Acido de glucosa	+	d
L-arabinosa	+	d
D-xilosa	+	d
D-manitol	+	+
Hid. caseina	+	+
Hid. gelatina	+	+
Hid. almidón	+	+
Util. de citrato	+	+
Crec. a pH 6,8	-	-
Crec. a pH 5	+	d
Red. de nitratos	+	-
Reac. lecitinasa	+	-
Voges Proskauer	+	-

Referencias :

positivo : +

negativo : -

dudoso : d

A : Bacillus subtilis

B : Bacillus megaterium

La Tabla X muestra los resultados que se obtuvieron en los cultivos y en el test IMVyC, utilizados para la caracterización de los coliformes.

Las cepas 1, 2 y 3 se identificaron como coliformes "irregulares", es decir, que respondieron a características de estas bacterias que no mostraron las reacciones típicas de *Escherichia coli*, ni de otros coliformes. Las cepas 4, 5 y 6 dieron resultados coincidentes con los que presenta el grupo denominado "intermedio tipo I" (ICMSF 1983). Ninguna de las cepas desarrolló colonias verdosas con brillo metálico en EMB, ni tampoco crecieron a 44,5 °C.

No se identificaron microorganismos pertenecientes al género *Enterobacter* ni *Citrobacter*. En masas madre españolas se encontraron  $5,2 \cdot 10^2$  coliformes/g (Barber y Báguena 1988). Los valores fueron similares a los encontrados en otras masas madre (Galli y Ottogalli 1973). Sin embargo, los mismos autores señalan que no han podido detectar coliformes en algunas masas, debido probablemente al pH muy bajo.

En estos trabajos, no se han realizado seguimientos de los coliformes a lo largo del proceso, por lo tanto no se han podido comparar con los resultados obtenidos de esta investigación.

TABLA X : Características de los coliformes totales aislados de las masas.

Cepas	Cultivo en caldo Mc Conkey, incubación: 37 °C, 48 h	Cultivo en caldo Mc Conkey, inc: 44,5 ° C, 48 h	I	M	V	C
1	+ ( ácido y gas )	-	-	-	-	+
2	- ( ácido y gas )	-	-	-	-	+
3	+ (ácido) - (gas)	-	-	-	-	+
4	+ (ácido) poco gas	-	-	+	+	±
5	+ ( ácido y gas )	-	-	+	+(d)	+
6	+ ( ácido y gas )	-	-	+	+	+

Referencias : + (positivo) ; - (negativo) ; ± (variable) ; +(d) positivo débil ; I : Indol ; M : Rojo de metilo ; V: Voges Proskauer ; C : Citrato

Los mohos y las levaduras no fueron caracterizadas por pruebas bioquímicas y/o fisiológicas. Se realizaron conteos y se observaron las características de las colonias. Cabe destacar que el recuento de mohos mostró valores en marcado descenso durante el desarrollo de las etapas de panificación.

#### 4.- Efectos de los microorganismos en las masas

##### 4.1. - Acción de los microorganismos sobre sustratos básicos

Los microorganismos ejercen acciones específicas sobre determinados sustratos de las masas, que tienen gran importancia en la panificación. Los principales efectos de los microorganismos se manifiestan a través de reacciones hidrolíticas frente a almidón, proteínas o lípidos o por procesos fermentativos frente a carbohidratos simples.

Las  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas propias de las harinas y las que provienen de los microorganismos hidrolizan el almidón y producen azúcares simples como maltosa, maltotriosa o glucosa. Para acelerar la degradación del almidón pueden agregarse amilasas de la malta o glucoamilasas fúngicas que completan la acción de las enzimas propias del sistema (Bourgeois y Larpent 1995)

También se producen reacciones de hidrólisis frente a sacarosa, incorporada a las masas o rafinosa proveniente del cereal. Como resultado de estas acciones se generan azúcares simples como glucosa, fructosa, galactosa, etc. (Bourgeois y Larpent 1995)

La acción de los microorganismos frente a las proteínas da origen a péptidos y aminoácidos. Algunos productos resultantes, como glutamina, prolina, alanina, arginina, etc, son necesarios para el crecimiento de levaduras al comenzar la fermentación (Bourgeois y Larpent 1995). En general, cabe destacar que la presencia de material nitrogenado soluble en el medio, favorece el desarrollo y la actividad de los microorganismos fermentativos.

La lipólisis es relativamente limitada, pero la pequeña cantidad de productos que en ella se producen puede influir sobre el gusto y el aroma (Bourgeois y Larpent 1995).

En la fermentación láctica de los carbohidratos, las bacterias acidolácticas sintetizan su ATP y producen ácido láctico, como producto final (homofermentación) o son capaces de generar además del ácido láctico, etanol, acetato y  $\text{CO}_2$  (heterofermentación).

La actividad amilolítica, proteolítica, lipolítica y fermentativa de los microorganismos se estudió sobre distintos sustratos. Para ello, se emplearon los componentes básicos de las harinas y de las masas y se consideraron las posibles acciones de los microorganismos.

#### 4.1.1.- Actividad amilolítica

Esta investigación se desarrolló empleando distintas técnicas y un medio base con almidón de trigo. Se aplicó para las cepas *L.plantarum*, *L.brevis*, *L.confusus*, *M.luteus*, *M.kristinae*, *M.lylæ* y *B.subtilis*. No se realizó para *L.casei subsp.casei* porque este microorganismo se obtuvo en los últimos aislamientos.

Cuando se empleó el cultivo en placa, el grado de hidrólisis se expresó por cruces, de acuerdo al tamaño del halo transparente observado después de revelar por Lugol.

Los resultados que se exhiben en la Tabla XI indican que los *Lactobacillus* presentaron una actividad amilolítica regular o débil a las 3 y a las 24 horas de incubación. Excepto para *L.plantarum* donde se observó una reacción positiva débil, los demás lactobacilos no mostraron capacidad para formar carbohidratos simples. Los valores de absorbancias leídos para el complejo iodo-almidón remanente, indicaron también una acción hidrolítica no muy marcada aunque un poco más notable para *L.plantarum*. A las 3 horas de incubación los porcentajes de conversión del almidón fueron bajos ( 8,54 % para *L.plantarum*, 2,44 % para *L.brevis* y 2,44% para *L.confusus*), valores que sólo aumentaron ligeramente con 24 horas de incubación. Para este tipo de microorganismos, no pudo detectarse actividad amilolítica por extracción de amilasas extracelulares y la longitud de las cadenas de almidón, medidas por oxidación con periodato de sodio, mostraron pocos cortes o presencia de cadenas más largas.

El microorganismo que mostró mayor actividad amilolítica en los distintos medios, fue *B.subtilis*. Esta especie evidenció capacidad para formar carbohidratos reductores simples y produjo una conversión del almidón a las 3 horas de incubación de 12,2 % y a las 24 horas de 34 %. También se observaron resultados positivos por actividad de amilasas extracelulares. Esta actividad se determinó por la presencia de carbohidratos reductores que se obtuvieron después de incubar la enzima con almidón cocido en condiciones óptimas. No se obtuvo igual efecto cuando se enfrentó a la enzima con almidón crudo.

Para considerar estos resultados es importante tener en cuenta, que *B.subtilis* no pudo aislarse de las masas preparadas en este caso y que en general no forma parte de la microflora natural de las mismas, aunque sí pudo aislarse de las muestras de harinas.

Las especies de *Micrococcus* ensayadas no mostraron capacidad para hidrolizar el almidón en ningún caso.

Por otro lado, la harina sola mostró una actividad diastásica mucho mayor comparada con la de los lactobacilos y también mayor a la obtenida frente a las amilasas de *B.subtilis*.

La actividad diastásica de las harinas se evaluó por la capacidad de sus enzimas de formar azúcares reductores, expresados como mg de maltosa /10g de harina, en condiciones de temperatura y tiempo adecuadas.

En todos los casos fue posible determinar cuantitativamente la presencia de azúcares reductores.

Este ensayo se realizó con muestras de harina estériles (tomadas como muestras sin amilasas bacterianas), esterilizadas por radiación microonda y con muestras de harina que no habían recibido ningún tratamiento.



Los resultados para las harinas estériles variaron entre 101-106 mg de maltosa por cada 10 g de harina y para las mismas muestras sin esterilizar, entre 116-121 mg de maltosa /10 g de harina. Estos valores indican que no existen diferencias notables. Si esta variación es atribuible a la presencia de amilasas bacterianas podría interpretarse que su actividad es escasa, coincidiendo esto con los resultados anteriores.

Esto indica además que la amilasa de la harina (no de origen microbiano) no es afectada por el tratamiento con microondas realizado.

Los valores de actividad diastásica obtenidos resultaron algo menores que los hallados por otros autores. Harinder y Bains (1987) empleando la técnica de la AACC 1976, encontraron resultados de 220 mg de maltosa/10 g.

TABLA XI: Actividad amilolítica de *Lactobacillus* y *Bacillus*

	<i>L.plantarum</i>	<i>L.brevis</i>	<i>L.confusus</i>	<i>B.subtilis</i>	T(*)
Cultivo en placa (+: 1 mm)	++	++	+	+++	-
Presencia de carbohidratos a las 3 h	+ débil	-	-	+ débil	-
Presencia de carbohidratos a las 24 h	+ débil	-	-	+ débil	-
Almidón remanente (en valores de absorbancia): 3 h	0,75	0,80	0,80	0,72	0,82
Almidón remanente a las 24 h	0,70	0,73	0,79	0,54	0,82
Por extracción de amilasas extracel.	-	-	-	+ débil	-
Longitud de cadena, en unidades de glucosa) por ox. c/ $\text{IO}_4^-$	14,73	18,93	20,71	4,73	-

(\*) T- (testigo) : almidón sin hidrolizar  
(-) : negativo (+) : positivo

Ox. c/ $\text{IO}_4^-$ : Oxidación con periodato  
(+ : 1 mm) : halo de hidrólisis de 1 mm

#### 4.1.2. - Actividad proteolítica

En el proceso de panificación y sobretodo durante la fermentación de la masa concurren circunstancias favorables tanto para generar aminoácidos libres y péptidos como para transformarlos y consumirlos. Las bacterias acidolácticas, que contienen proteasas y peptidasas producen un aumento del nitrógeno total soluble en agua pero también tiene lugar un consumo neto de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular (Benedito de Barber y col. 1985)

La acción controlada de estas enzimas sobre las proteínas de la masa panaria durante la fermentación, libera fragmentos nitrogenados que contribuyen a la plasticidad de la masa, a la elasticidad del gluten y a la textura del pan aumentando el volumen y la coloración de la corteza (Collar y col. 1991).

Se ha comprobado durante la fermentación de masas agrias de harina de centeno ( Spicher y Nierli, 1984 a y b y 1988), y de masas de trigo (Benedito de Barber y col. 1985 y 1986, Collar y col. 1991, Prieto y col. 1990 ) la actividad hidrolítica (endo y exoproteolítica) de las bacterias acidolácticas por el incremento en el contenido de aminoácidos y en la solubilidad proteica. También se ha descrito la evolución, durante la fermentación, de los aminoácidos totales e individuales de masas panarias de harina de trigo iniciadas por cultivos puros y mixtos de bacterias acidolácticas (Collar y col. 1991; Collar Esteve 1994 a y b).

Collar y col. (1991) han investigado comparativamente la capacidad de degradación hidrolítica de polipéptidos y proteínas de cultivos puros de bacterias acidolácticas homo y heterofermentativas, por electroforesis comparativas realizadas sobre las proteínas de las masas, conteniendo distintos inoculos de dichas bacterias. El perfil electroforético de las fracciones nitrogenadas solubles de masas iniciadas por cultivos puros de bacterias lácticas, detecta cambios cualitativos y cuantitativos durante la fermentación, en subunidades de alto y bajo peso molecular.

En este trabajo, la capacidad de los microorganismos aislados de las masas de producir endo y exoproteasas, se evaluó enfrentando las cepas con distintos sustratos proteicos en medios de cultivo sólidos, en los cuales se determinó la presencia o ausencia de halos de hidrólisis y en medios de cultivo líquidos, en los cuales se midió por espectrofotometría, el incremento de absorción de las proteínas hidrolizadas, a 280 nm.

Los resultados de la actividad proteolítica de los microorganismos, obtenidos por cultivo en placa, se observan en la Tabla XII.

En este caso, la proteólisis se midió frente a gelatina, caseína y proteínas del gluten. Los lactobacilos dieron resultados negativos frente a gelatina y los micrococos resultados variables. La caseína fue hidrolizada por todas las especies de lactobacilos, mientras que los micrococos también dieron en este medio resultados variables. Sólo la especie *M.kristinae* mostró para las tres proteínas actividad hidrolítica nula. Frente a las proteínas del gluten la actividad de los lactobacilos y de los micrococos fue débil o negativa. *Bacillus subtilis* resultó el microorganismo que mostró mayor poder proteolítico, el cual se manifestó

frente a los tres tipos de proteína ensayadas. Debe tenerse en cuenta que esta especie no forma parte de la microflora normal de las masas y sólo fue aislado de las harinas.

TABLA XII : Actividad proteolítica de los microorganismos.  
( resultados obtenidos por cultivo en placa )

Cepas aisladas	<i>L.p.</i>	<i>L.b.</i>	<i>L.c.</i>	<i>M.k</i>	<i>M.lu.</i>	<i>M.ly.</i>	<i>B.s.</i>
Gelatina	-	-	-	-	±	±	+
Caseína	+	+	+	-	±	±	+
Proteínas del gluten	+(d)	+(d)	-	-	-	-	+

Referencias : + : positivo      - : negativo      ± : variable      +(d) : positivo débil

*L.p.* : *L.plantarum* ; *L.b.*: *L.brevis* ; *L.c.*: *L. confusus* ; *M.k.*: *M.kristinae* ; *M.lu.*: *M.luteus* ; *M.ly.*: *M.lylæ* y *B.s.*: *B.subtilis*

En los medios líquidos, se utilizó un medio base de la misma composición que los respectivos medios sólidos pero sin agar. Los resultados se muestran para los medios preparados con caseína, con gluten al 0,3 % p/v, con gliadinas al 0,3 % p/v y con gluteninas al 0,3 % p/v. Los medios con gelatina sólo se emplearon para algunas pruebas porque los espectros de las soluciones patrones a 280 nm no mostraron picos bien definidos y los espectros obtenidos después de sembrar e incubar los microorganismos, coincidieron prácticamente con los de las soluciones patrones.

Los mejores resultados se obtuvieron con caseína, por lo tanto con esta proteína se realizaron ensayos a las 3 horas y a las 24 horas de incubación.

Los medios se inocularon con las cuatro cepas de lactobacilos y con las tres cepas de micrococcos.

Se empleó como blanco el medio de cultivo conteniendo la proteína, sin sembrar, tratado después de la incubación igual que las muestras sembradas. Los espectros que se muestran en las Figuras 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, representados por las líneas continuas corresponden a estos blancos, es decir, a las distintas proteínas sin hidrolizar.

Las Figuras 3 y 4 muestran los espectros que se obtuvieron a las 3 horas y a las 24 horas de incubación respectivamente, con los extractos de los cultivos de las cuatro cepas de lactobacilos en medios con caseína.

A las 3 horas de contacto a 37 °C, se observó un inicio de la actividad de proteasas para las cuatro cepas, un poco más marcada para *L.casei subsp.casei*,

Las cepas *L.confusus* y *L.brevis*, dieron señales parecidas, sin mucha tendencia a formar un pico y *L.plantarum* es el que mostró un hombro con la absorbancia mas baja.

A las 24 horas de incubación, los espectros muestran picos de absorbancia bien definidos, lo que está indicando proteólisis neta. En las mismas condiciones de trabajo, *L.brevis*, dió origen a un pico muy marcado y con la absorbancia más alta. *L.plantarum* también reveló la presencia de los productos de hidrólisis, dando picos característicos con una absorbancia aproximada de 1,5. Estos valores de absorbancia también pueden indicar la generación de productos con distinto contenido de aminoácidos aromáticos o sea presencia de proteasas con diferente punto de corte.

Los espectros correspondientes a los extractos de *L.confusus* y *L.casei subsp.casei* indican menor actividad proteolítica o consumo de los productos de hidrólisis, a las 24 horas de incubación.

Si se comparan los espectros de las 3 y de las 24 horas de incubación, se observa que la degradación hidrolítica difiere notablemente en magnitud y en velocidad en función de la especie bacteriana. Aparentemente las especies *L.brevis* y *L.plantarum* mostraron inicialmente menor actividad proteolítica, sin embargo, el nivel de polipéptidos y aminoácidos que originan picos de absorción característicos a 280 nm, aumentó progresivamente y mostró valores más altos, que los observados para *L.confusus* y *L.casei subsp.casei*, a las 24 horas.

Collar y col. (1991) también observaron en masas fermentadas, una acumulación de polipéptidos y una peptidización de subunidades proteicas en grado variable, dependiendo de la especie acidoláctica iniciadora.

La Figura 5 muestra los resultados que se obtuvieron al correr espectrofotométricamente los extractos de los cultivos con gluten, después de 24 horas de incubación. Los espectros revelan un ligero inicio de proteólisis y una actividad de los microorganismos comparable con la que se observó a las tres horas de incubación con caseína, pero de menor magnitud.

La Figura 6 exhibe el espectro que se obtuvo a partir del extracto del medio de cultivo conteniendo gluten, al que no se le incorporaron microorganismos, que se empleó como testigo. También se muestran los espectros de los sobrenadantes de cultivos de 24 horas de *L.brevis* y *L.plantarum* desarrollados en medios que contenían las fracciones de gliadinas y gluteninas, fraccionadas previamente sobre la base de su solubilidad (Primo Yúfera 1979). Para ambas especies de microorganismos, sus proteasas parecen ser algo más activas frente a gliadinas que frente a gluteninas, pero al igual que para el gluten, se observa también baja actividad para las fracciones separadas.

En la Figura 7 se observan los hombros característicos que se obtuvieron con gelatina sin sembrar, usada como testigo y con los cultivos de las cuatro cepas de lactobacilos, después de 24 horas de incubación. En este caso, la actividad es muy baja a 280 nm y además parecería observarse un segundo pico, también muy poco notable, cercano a 285 nm.

Las Figuras 8 y 9 muestran los resultados correspondientes a las acciones desarrolladas por las especies de *Micrococcus* aisladas de las masas, *M.kristi-*

*nae*, *M.luteus* y *M.lylæ*. Los micrococos exhibieron poca actividad hidrolítica frente a las proteínas ensayadas. Frente a las proteínas del gluten (Figura 8). *M.kristinae* fue el que mostró menor actividad, coincidiendo estos resultados con los obtenidos por cultivo en placa. Frente a gliadinas y gluteninas se ensayaron las cepas *M.luteus* y *M.lylæ* (Figura 9). Ambos mostraron mayor capacidad para hidrolizar gliadinas que gluteninas, observándose un efecto ligeramente mayor para *M.lylæ*.

Si se comparan los resultados obtenidos espectrofotométricamente a partir de los medios líquidos con los leídos en los cultivos en placa, se observa que los lactobacilos muestran un comportamiento similar en ambos medios. Frente a la gelatina prácticamente no resultaron activos, ya que en las placas no se observaron halos de hidrólisis y los espectros dieron picos poco notables. Frente a caseína mostraron la mayor capacidad proteolítica, detectada tanto en placa como en los espectros. Frente a las proteínas del gluten, en los cultivos en placa *L. plantarum* y *L. brevis* presentaron pequeños halos de hidrólisis y los espectros también mostraron poca actividad. *L.confusus* dió negativo en placa y a juzgar por su espectro, en medios líquidos también la actividad fue nula.

Los micrococos también mostraron resultados coincidentes. Para *M. luteus* y *M. lylæ*, las placas conteniendo gluten mostraron halos pequeños y en muchos casos no se observaron y los espectros indicaron poca actividad. Por otro lado, el espectro de *M. kristinae* fue el más cercano al de la proteína sin hidrolizar coincidiendo este resultado con el obtenido en el cultivo en placa.

No se analizó el efecto de *B. subtilis* en medios líquidos, por lo que no es posible comparar los resultados.

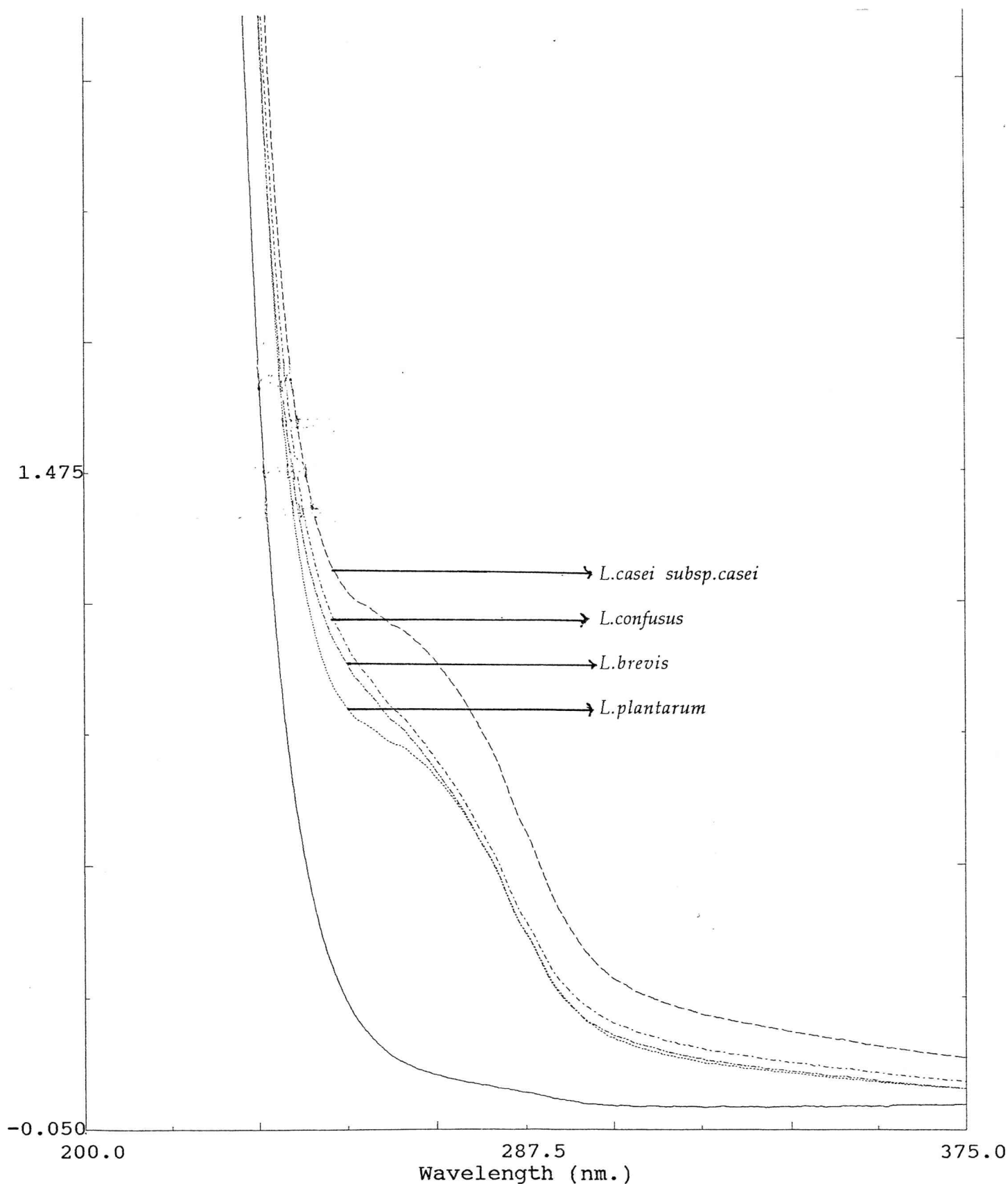


FIGURA 3 : *L.casei subsp. casei*, *L.confusus*, *L.brevis* y *L.plantarum* frente a la caseína, a las 3 horas de incubación.

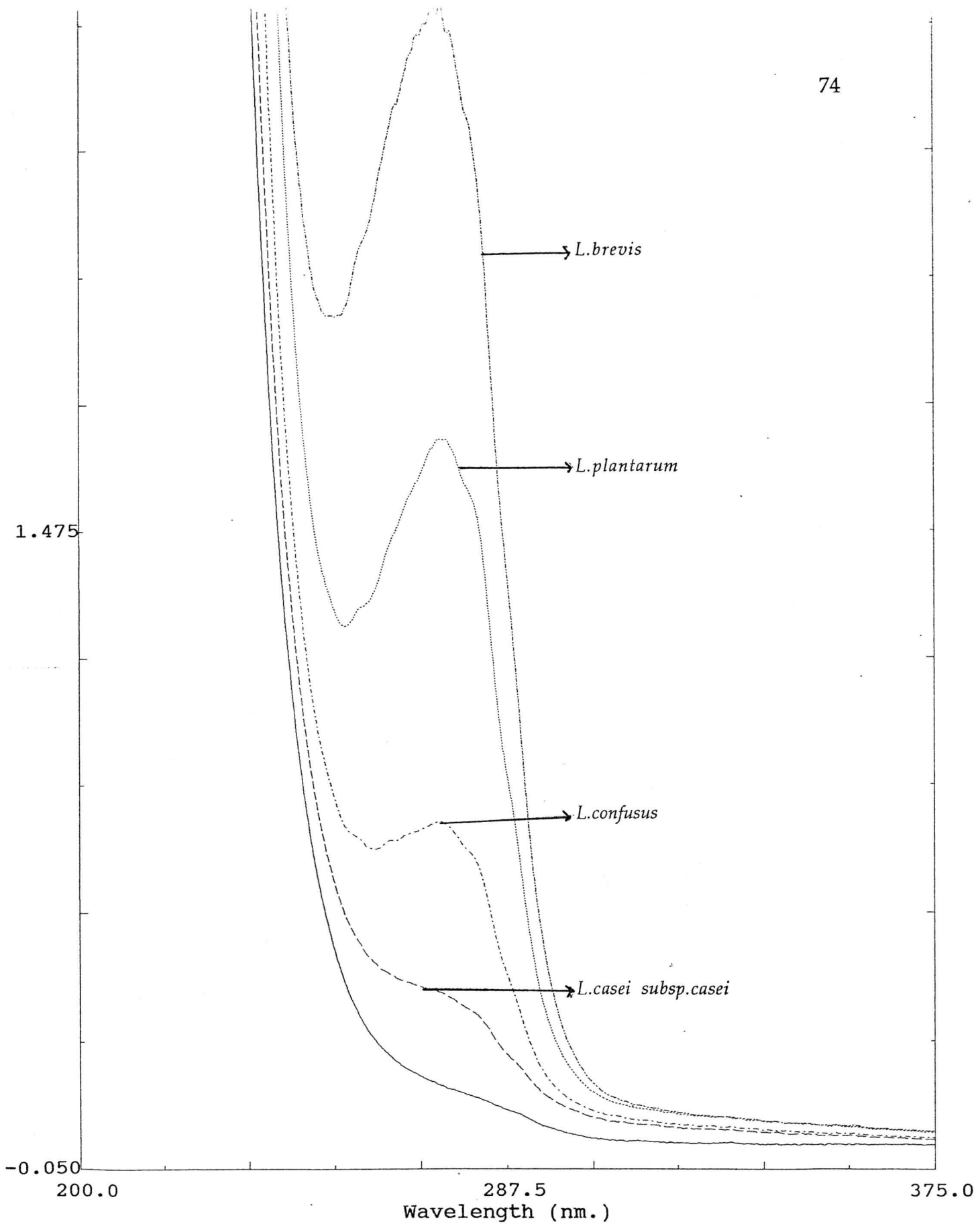


FIGURA 4: *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. confusus* y *L. casei subsp. casei*, frente a la caseína, a las 24 horas de incubación.

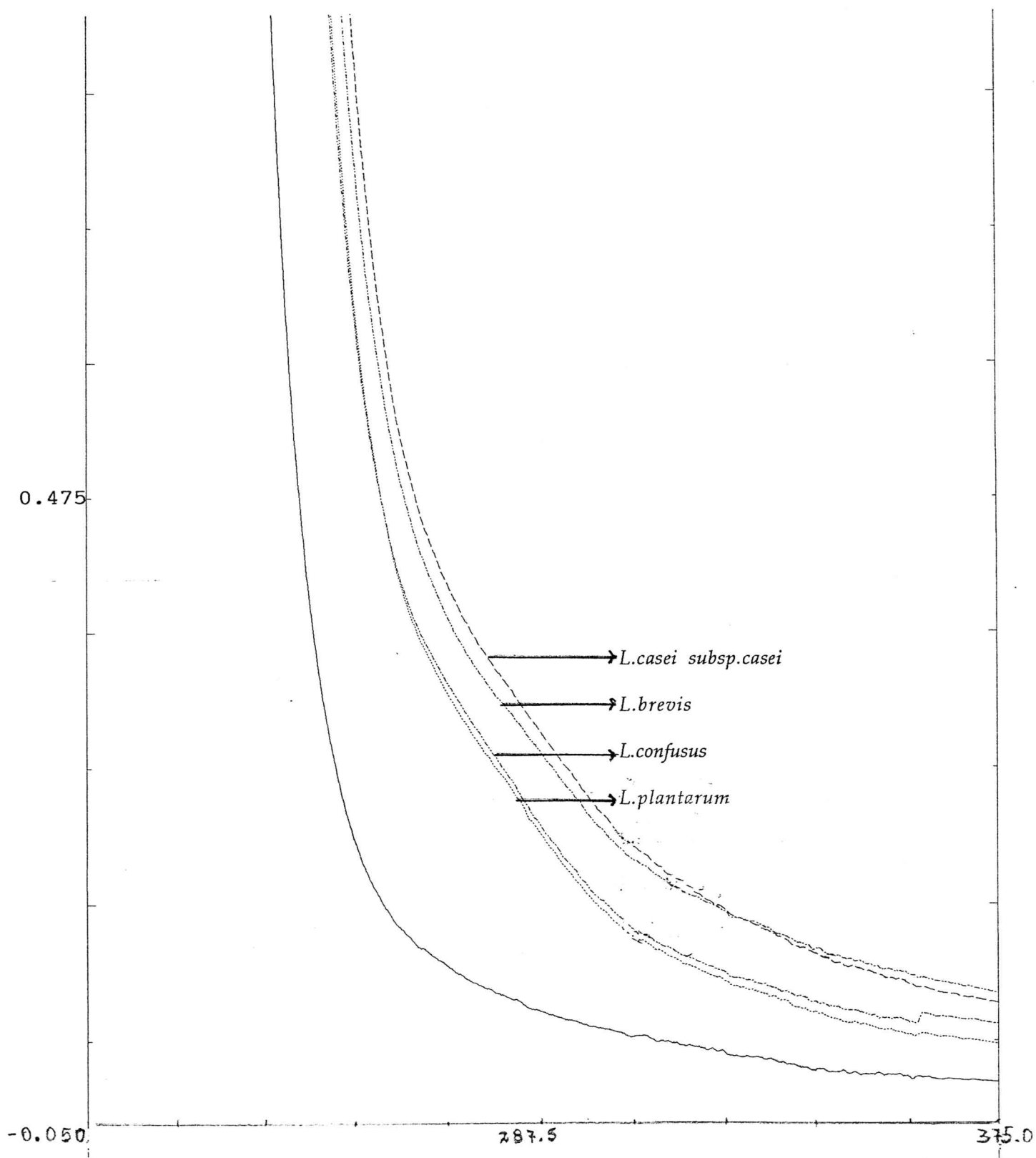


FIGURA 5 : *L. casei subsp. casei*, *L. brevis*, *L. confusus* y *L. plantarum* frente a las proteínas del gluten, a las 24 horas de incubación.



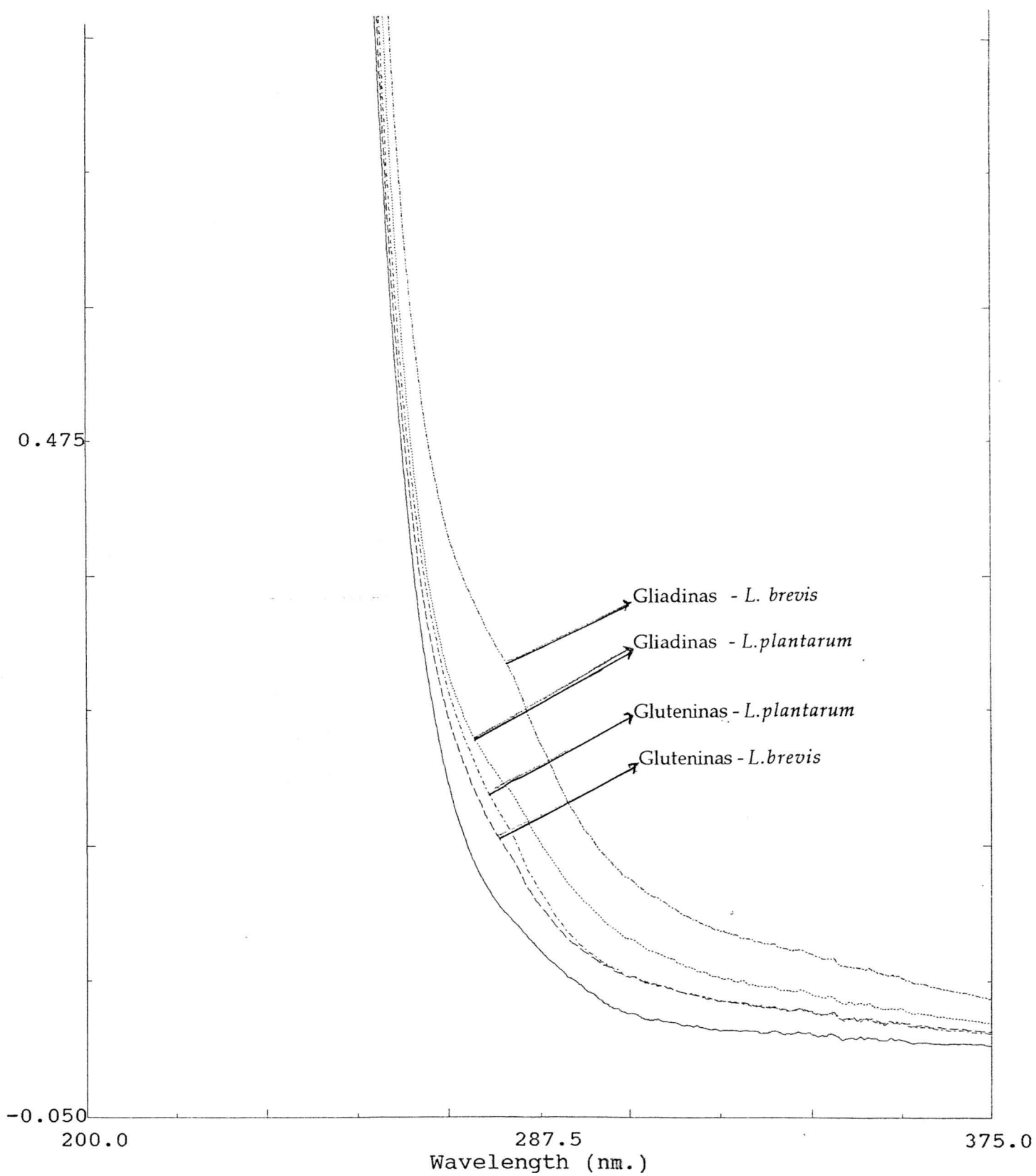


FIGURA 6 : *L.brevis* y *L.plantarum* frente a gliadinas y gluteninas

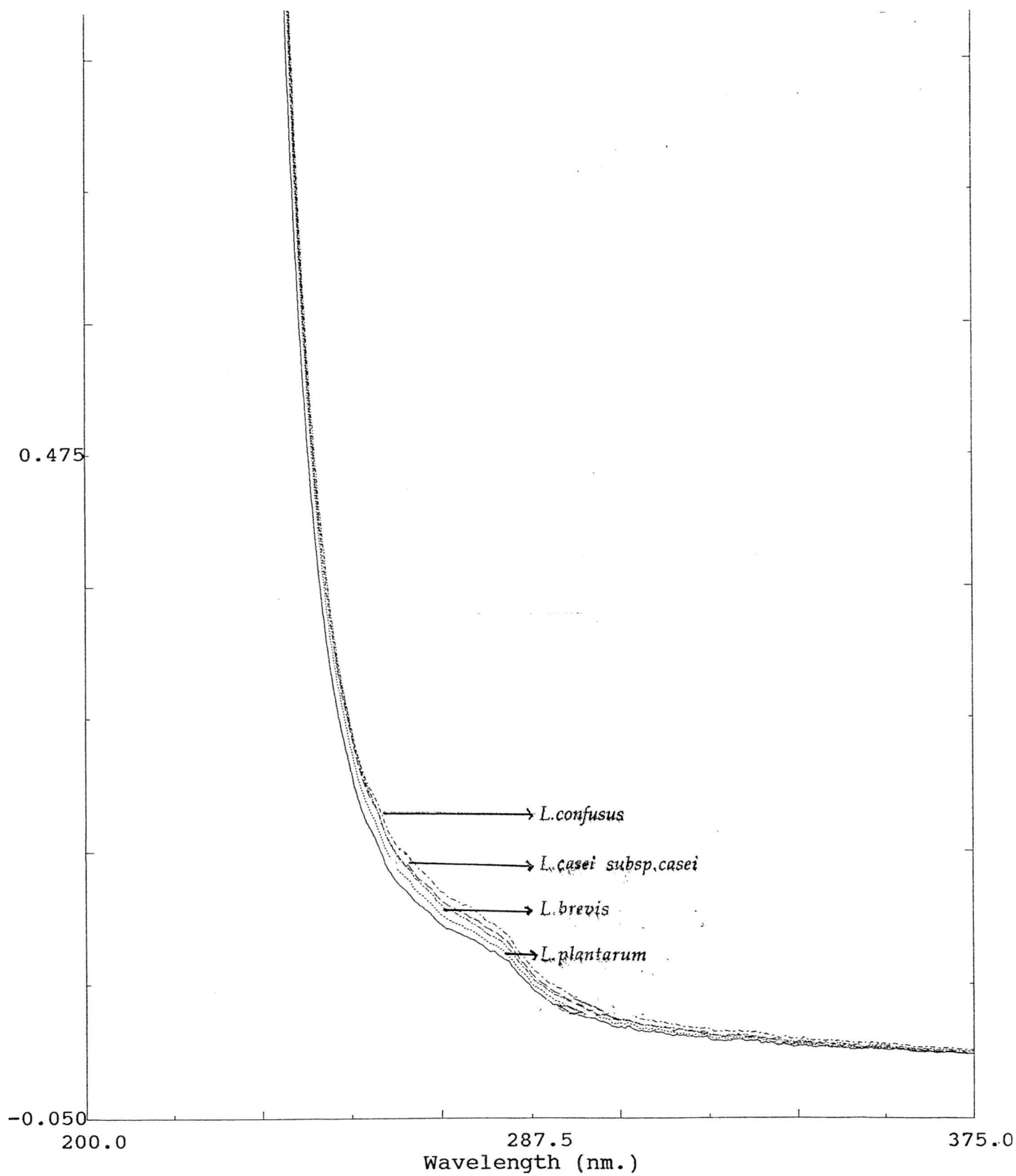


FIGURA 7 : *L.confusus*, *L.casei subsp.casei*, *L.brevis* y *L.plantarum* frente a gelatina, a las 24 horas de incubación.

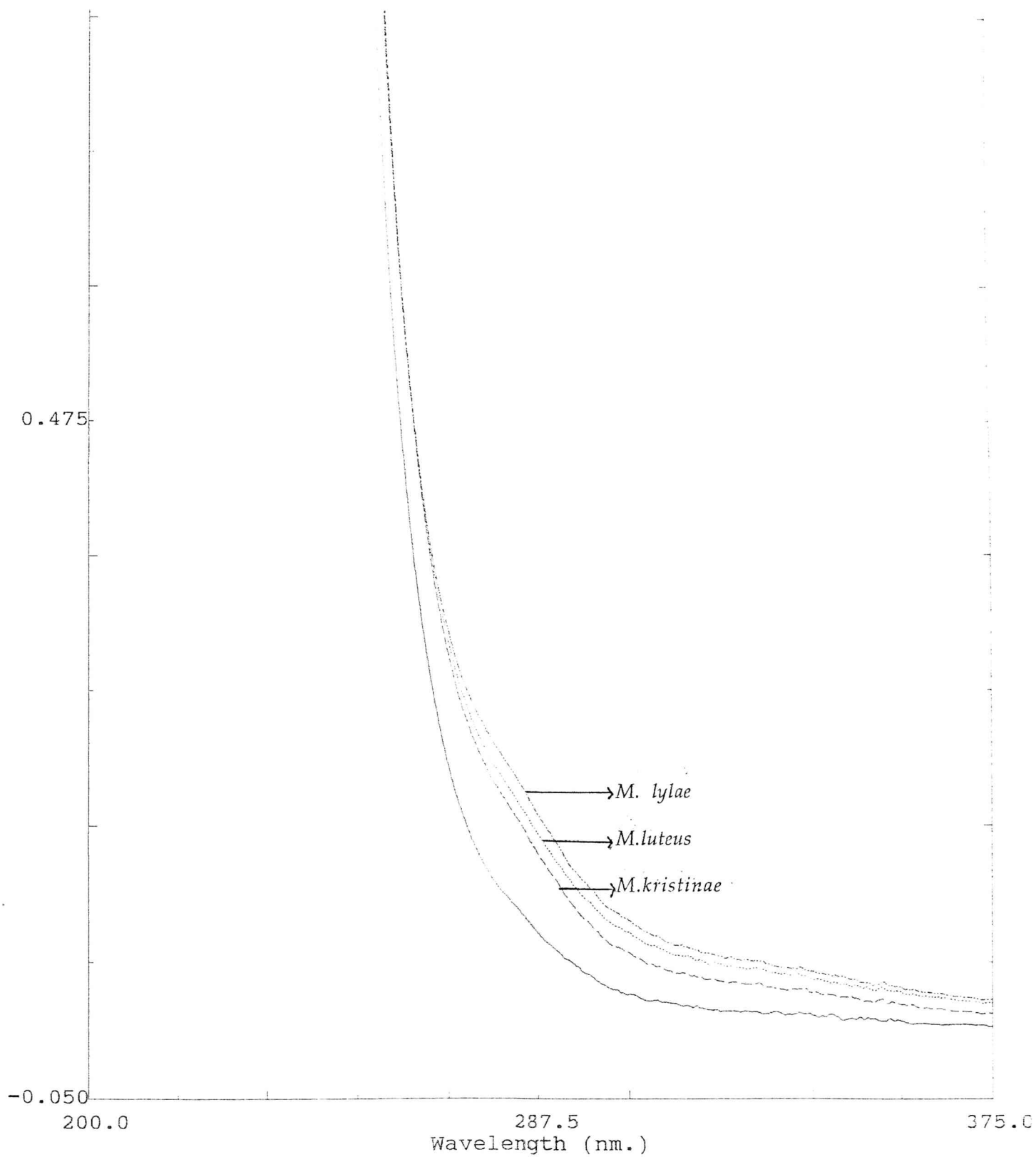


FIGURA 8 : *M. lylae*, *M. luteus* y *M. kristinae* frente a las proteínas del gluten, a las 24 horas de incubación.

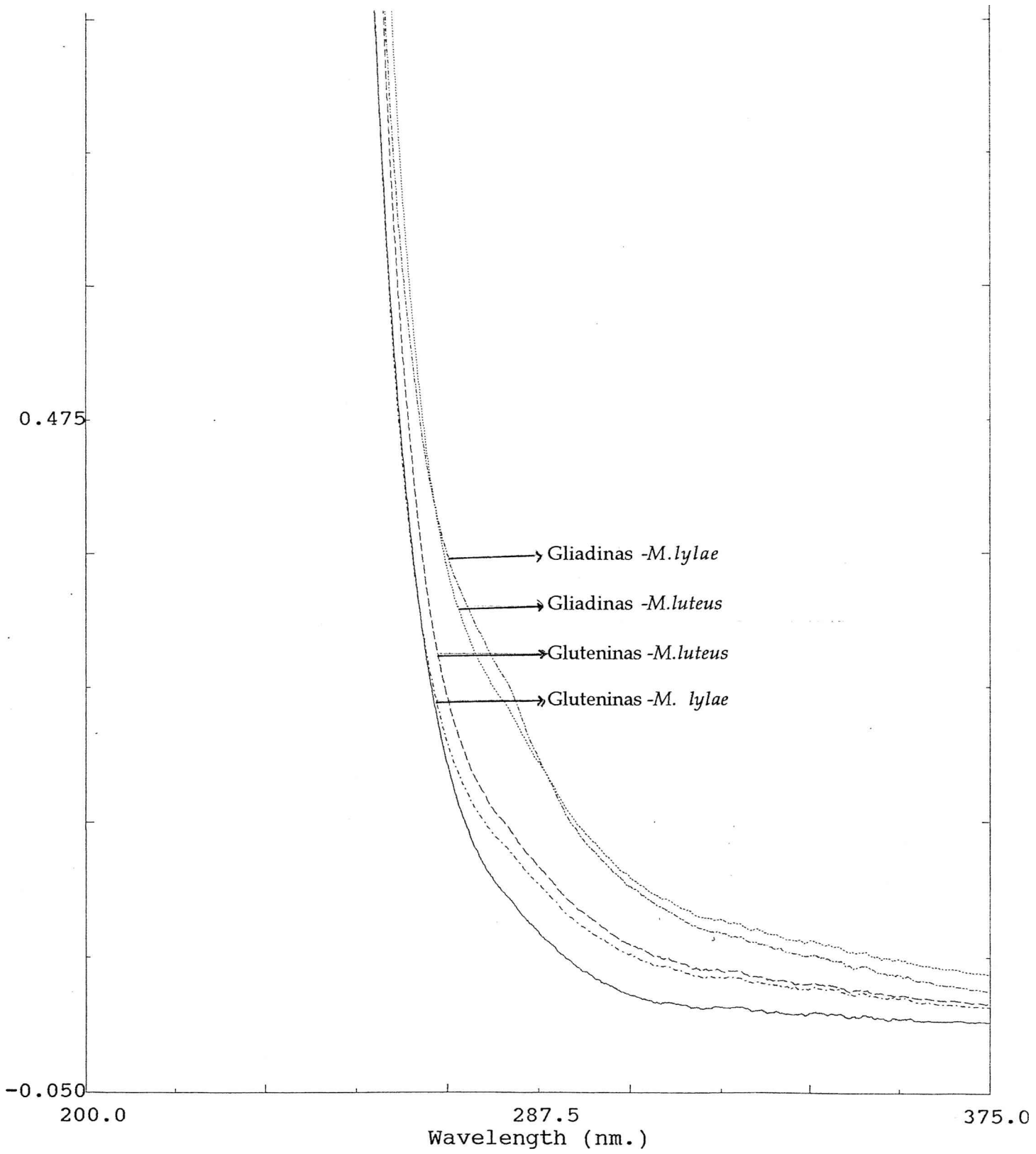


FIGURA 9 : *M. lylae* y *M. luteus* frente a gliadinas y gluteninas, a las 24 horas de incubación.

#### 4.1.3.- Actividad lipolítica

Muchos microorganismos pueden producir enzimas lipolíticas, pero para que pueda tener lugar la lipólisis, debe existir un sustrato acuoso y el alimento debe contener normalmente grasas, dado que la presencia de lípidos en los alimentos es la que estimula el predominio en los mismos de las especies lipolíticas (Mossel y Moreno García 1985)

El sustrato clásico que se utiliza en microbiología para detectar la presencia de estas enzimas es la tributirina y los resultados se interpretan como presencia o ausencia de halos de hidrólisis.

En esta investigación no se detectó actividad lipolítica frente a la tributirina, incorporada a un medio de cultivo en placa, para ninguna de las cepas aisladas de la masa. Teniendo en cuenta que existen especies de lactobacilos y micrococos que pueden contener estas enzimas, este resultado podría explicarse considerando que las masas de panadería prácticamente no contienen grasas y el tiempo necesario para el desarrollo de las mismas es relativamente corto y tal vez no suficiente para originar estas reacciones.

#### 4.1.4.- Fermentación de los carbohidratos

Los principales azúcares simples que pueden estar presentes en las masas pueden ser maltosa, glucosa, sacarosa, fructosa y rafinosa.

Ya en 1919, Orla-Yensen, clasificó a las bacterias lácticas, según su forma de fermentar a los carbohidratos en homofermentativas y heterofermentativas. La diferencia de estos dos grupos cuando fermentan la glucosa u otras hexosas, es detectable por la producción de CO<sub>2</sub>. Las bacterias heterofermentativas no tienen fructosa-difosfato aldolasa y por lo tanto degradan los glúcidos por la vía llamada de las pentosas fosfatos o de las hexosas fosfatos (Bourgeois y Larpent 1995). Como resultado de esta característica bioquímica, las homofermentativas producen principalmente ácido láctico y las heterofermentativas dan origen a ácido láctico, etanol y CO<sub>2</sub>. También se pueden formar trazas de acetato en los dos casos (Thornhill y Cogan 1984). Muchos *Lactobacillus* homofermentativos, pueden producir además de ácido láctico, formiato, etanol y acetato en determinadas condiciones. No se trata de una desviación de la ruta hacia la de las pentosas, sino que una parte del piruvato se transforma en acetyl-CoA y produce etanol y acetato (Bourgeois y Larpent 1995)

*L.casei subsp.casei* y *L.plantarum* pertenecen al Grupo II que son lactobacilos heterofermentativos facultativos. Las hexosas son fermentadas por la vía de Embden-Meyerhof dando casi exclusivamente ácido láctico. Algunas especies forman ácido láctico y en cantidades mínimas ácido acético, etanol y ácido fórmico bajo condiciones limitadas de glucosa. Las pentosas son fermentadas a ácido láctico y ácido acético por la vía de la fosfocetolasa (Bergey's Manual 1986).

*L.brevis* y *L.confusus* pertenecen al grupo III que son los lactobacilos

heterofermentativos obligados. Por lo tanto, a partir de las hexosas forman los productos mencionados, más CO<sub>2</sub>.

Los *Micrococcus* en general utilizan la glucosa aerobicamente originando acidificación del medio, por metabolismo oxidativo.

Se determinó la formación de ácido y gas para la glucosa y se observó la formación de ácido para los demás azúcares. Los resultados que se muestran en la Tabla XIII indican que los lactobacilos son más activos frente a los azúcares que los micrococos, a excepción de *M.kristinae* que mostró capacidad para fermentar la mayoría de los azúcares. Los lactobacilos formaron ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa y fructosa y produjeron resultados variables frente a rafinosa. La formación de gas a partir del sustrato glucosa solo se pudo comprobar para *L.brevis* y *L.confusus*. *B. subtilis* mostró resultados variables.

TABLA XIII : Efecto de los microorganismos sobre los azúcares simples

Cepas	<i>L.p.</i>	<i>L.b.</i>	<i>L.c.</i>	<i>L.ca</i>	<i>M.k.</i>	<i>M.lu.</i>	<i>M.ly</i>	<i>B.s.</i>
<b>Sustrato</b>								
Glucosa								
Formación de : ácido	+	+	+	+	+	-	-	+
Formación de gas	-	+	+	-	ND	ND	ND	-
<b>Sustratos</b>								
Maltosa								
Formación de ácido	+	+	+	+	+	-	-	+
Sacarosa								
Formación de ácido	+	±	+	+	+	-	-	-
Rafinosa								
Formación de ácido	+	±	-	-	+	-	-	ND
Fructosa								
Formación de ácido	+	+	+	+	ND	ND	ND	-

Referencias : +: positivo; -: negativo; ±: variable; ND: No determinado

*L.p.*: *L.plantarum*  
*M.k.*: *M.kristinae*

*L.b.*: *L.brevis*  
*M.lu.*: *M,luteus*

*L.c.*: *L.confusus*  
*M.ly.*: *M.lylae*

*L.ca.*: *L.casei casei*  
*B.s.*: *B.subtilis*

## 5.- Preparación de las masas con especies puras

### 5.1.- Esterilización de las harinas

El objetivo de la esterilización normalmente es reducir la presencia de los microorganismos patógenos y conseguir que una proporción importante de los microorganismos alterantes no pueda reproducirse, ya sea porque están muertos o porque su crecimiento está inhibido (Bourgeois y col. 1994).

En este caso, el objetivo de la esterilización fue reducir al máximo o eliminar totalmente la flora propia de las harinas, a fin de poder estudiar el efecto de los microorganismos, agregados a las masas como cepas o especies puras.

#### 5.1.1.- Aplicación del calor

Los microorganismos esporulados son los más difíciles de destruir y existen diversos factores, que deben tenerse en cuenta, que influyen sobre la termorresistencia, tales como resistencia de la propia cepa, factores ambientales durante la esporulación y condiciones del medio durante el tratamiento térmico. Teniendo en cuenta estos factores, en este caso, se seleccionaron para los tratamientos, temperaturas altas, a distintos tiempos (ICMSF 1984).

Cuando se realizan tratamientos térmicos a altas temperaturas, las condiciones del proceso se regulan sobre la base de la letalidad de las esporas y de la pérdida de calidad del alimento. La calidad organoléptica de los alimentos tratados por calor, se ve siempre perjudicada por la aplicación de la energía térmica necesaria para conseguir la estabilidad microbiológica. La dependencia de la temperatura de las diversas reacciones químicas de desnaturalización es, afortunadamente, mucho menor que la de la inactivación térmica de los microorganismos esporulados (Mossel y Moreno García 1985). Sin embargo, en este caso, debido a las características estructurales de la harina, la penetración del calor se vio dificultada y la aplicación tuvo que ser bastante enérgica.

En la Tabla XIV se muestran los valores de recuento de bacterias aerobias mesófilas y de mohos y levaduras, antes y después del tratamiento, como así también los resultados de las medidas del volumen de pan, después de realizar los ensayos de panificación.

Las muestras de 10 g presentaron un color ligeramente amarillento después de la esterilización y las de 50 g resultaron demasiado gruesas, por lo que se seleccionaron las de 25 g que habían recibido tratamiento, tanto para realizar las pruebas de supervivencia de los microorganismos como para efectuar los ensayos de panificación.

Se observó que la esterilización por calor, es un tratamiento que afectó a los componentes de la harina, causando un efecto negativo sobre el volumen de pan.

TABLA XIV : Efecto del calor sobre los microorganismos de la harina.

Tratamientos (Temperatura y tiempo)	130°C-15 minutos	130°C-25 minutos
Recuento de bacterias aerobias mesófilas (UFC/g)		
INICIAL	4800	4800
TRATADAS	1700	800
Recuento de mohos y levaduras (UFC/g)		
INICIAL	2900	2900
TRATADAS	180	100
Ensayos de panificación : Volumen de pan (ml /100g)		
INICIAL ( con harina no tratada)	490	490
Con harina TRATADA	280	200

### 5.1.2.- Exposición a la luz ultravioleta

La luz ultravioleta (UV) es un poderoso agente bactericida, siendo su longitud de onda más eficaz la que tiene alrededor de 260 nm. No es ionizable y al ser absorbida por las proteínas y ácidos nucleicos, determina cambios fotoquímicos que pueden conducir a la muerte celular. En las células bacterianas, el mecanismo de muerte originado por la luz ultravioleta, se debe aparentemente, a la producción de mutaciones letales, como resultado de su acción sobre los ácidos nucleicos celulares ((Jay 1981)

La elección de este procedimiento como técnica de esterilización de las harinas, se basó en la información existente respecto a su utilización como tratamiento superficial de muchos alimentos, empleándose en productos de bollería y pastelería, antes de ser envasados (Jay 1981)

Se seleccionaron las muestras de 25 g para realizar los ensayos. Los recuentos iniciales fueron : para aerobias mesófilas totales : 4800 UFC/g y para mohos y levaduras : 2900 UFC/g.

La exposición a la luz ultravioleta se realizó durante 2, 3, 4 y 5 horas, obteniéndose una reducción importante de la carga microbiana, sin llegar a valores muy cercanos a cero. Los ensayos de panificación se realizaron con las muestras de harina de mayor tiempo de exposición.

Los tratamientos con luz ultravioleta, mostraron resultados microbiológicos variables y un ligero descenso del volumen de pan.



TABLA XV : Efecto de la luz ultravioleta (  $\lambda$  254 nm ) sobre los microorganismos de la harina

Horas de exposición :	2	3	4	5
Recuentos de bacterias aerobias mesófilas (UFC/g)	400	420	400	235
Recuentos de mohos y levaduras (UFC/g)	440	420	245	260
Ensayo de panificación : Volumen de pan (ml/100g)				
INICIAL	-	-	-	490
Con harina TRATADA	-	-	-	450

No se observaron cambios de color en las muestras tratadas.

### 5.1.3.- Utilización de microondas

Cuando los alimentos electricamente neutros se sitúan en un campo electromagnético, las moléculas asimétricamente cargadas, son lanzadas primero en una dirección y después en otra. Durante ese proceso cada molécula asimétrica procura alinearse por si misma con la corriente alterna del campo, que constantemente está cambiando. Como las moléculas oscilan alrededor de su eje al intentar ir del polo positivo al negativo, se origina una fricción molecular, que determina la energía de las microondas y se manifiesta por un efecto térmico (Jay 1981). La mayor parte de las investigaciones sobre alimentos se han efectuado a las frecuencias de onda de 915 y 2450 megaciclos. En los ensayos realizados en este trabajo se emplearon frecuencias de onda de 2450 megaciclos y en general el tratamiento estuvo limitado por el efecto térmico producido por su empleo.

Las muestras tratadas con potencias 9 y 10 se expusieron 3, 5 y 10 minutos. Las que se colocaron a potencia 7 se mantuvieron en el horno 20, 10, 5 y 3 minutos.

Las muestras tratadas con la máxima potencia 5 y 10 minutos se tostaron totalmente. La que recibió 3 minutos de tratamiento mostró también cambios de color y olor a quemado. Las que se trataron a potencia 9, a los tiempos 10, 5 y 3 minutos se tostaron, observándose cambios de color desde el marrón hasta el pardo amarillento, al igual que las que se mantuvie-

ron a potencia 7 en períodos de tiempo de 20, 10 y 5 minutos. Debido a que solamente la harina expuesta 3 minutos, a potencia 7, no mostró cambios de color, se seleccionó ésta para los ensayos de panificación y microbiológicos. Estos últimos se hicieron también para las muestras expuestas 5 y 10 minutos a potencia 7.

Los resultados obtenidos con este tratamiento se exhiben en la Tabla XVI e indican que la aplicación de radiación microonda resultó muy efectiva para la destrucción de los microorganismos y en tiempos cortos (3 minutos) no afectó ni el color ni el volumen.

Por lo tanto, se seleccionó esta metodología para obtener harinas estériles que se utilizaron para la preparación de masas estériles a las que se le incorporaron los microorganismos.

TABLA XVI : Efecto del tratamiento con microondas sobre los microorganismos de la harina.

Tratamientos a potencia 7	Tiempos de exposición ( minutos )		
	10	5	3
<b>Recuento de bacterias aerobias mesófilas (UFC/ g)</b>			
INICIAL	4800	4800	4800
TRATADAS	S/D	170	140
<b>Recuento de mohos y levaduras (UFC/ g)</b>			
INICIAL	2900	2900	2900
TRATADAS	S/D	10	10
<b>Ensayos de panificación :</b>			
<b>Volumen de pan ( ml/100g)</b>			
INICIAL ( con harina no tratada)	-	-	490
Con harina TRATADA	-	-	490
Referencias:	S/D: Sin desarrollo	(-) : No realizado	

## 5.2.- Características de las masas preparadas con especies puras

Las masas preparadas con starters presentan mayor tiempo de mezclado, estabilidad y blandura. Fermentan en menos tiempo y tienen mayor capacidad de levado. Los panes preparados a partir de ellas se caracterizan por su mayor volumen, menor densidad, mayor altura de la rebanada y miga más esponjosa y blanda (Collar Esteve y col. 1994 a y b)

A las masas estériles se les adicionaron *L. plantarum* o *L. brevis*, ambos aislados o asociados con levadura. Estas experiencias se realizaron con la finalidad de determinar de que manera los agregados de estos microorganismos modifican las propiedades funcionales de las masas y afectan la acidez, durante el proceso de panificación y que influencia ejercen sobre las características del pan.

### 5.2.1.- Cambios de pH y acidez total valorable a lo largo del proceso

La propiedad de los microorganismos de producir acidificación de las masas, medible a través del pH, acidez total valorable o producción de ácidos láctico y acético, influye sobre las características funcionales de las mismas. Efectos interactivos de bacterias starters y levaduras fueron observados en la producción de ácidos láctico y acético, en productos de panificación de centeno (Spicher y col. 1981 y 1982).

Como es de esperar las masas preparadas sin levadura y sin bacterias lácticas, mostraron los valores mas bajos de acidificación, siendo estos datos concordantes con los publicados por Kline y col. (1971) y por Collar Esteve y col. (1994 a).

En masas con levadura, después de la fermentación final se alcanzaron valores de pH de 4,5 y para las masas preparadas con levadura y lactobacilos los valores finales de pH llegaron hasta 3,8-3,9. Los datos más bajos de de acidez a lo largo del proceso correspondieron a *L. brevis* asociado con levadura.

Los datos de acidez y pH obtenidos, estan de acuerdo con los resultados de las investigaciones realizadas por Barber y col. (1987a y 1989), por Faid y col. (1993) y por Collar Esteve y col. (1994 b)

Los cambios de pH a lo largo del proceso se muestran en las Figuras 10 y 11, para masas con y sin levadura y para masas con levadura a las que se le adicionaron especies de lactobacilos puras.

Las masas con levadura mostraron un descenso gradual del pH, con diferencias notables respecto a las masas sin levadura, en las que el pH luego de un ligero incremento inicial, se mantuvo en valores próximos a 5,4.

Las masas que contenían *L. plantarum*, registraron un descenso brusco de pH en el amasado, este efecto continuó hasta la prefermentación con un descenso marcado y mantuvo la misma tendencia en la fermentación final.

Las masas que se adicionaron de *L.brevis*, presentaron una disminución brusca al principio, un descenso ligero en la prefermentación y una estabilización del pH, hasta el final.

Los cambios de acidez valorable de estas masas, en general siguieron las tendencias observadas en el pH. A excepción de las masas sin levadura, las curvas mostraron formas similares, aunque con valores de acidez diferentes.

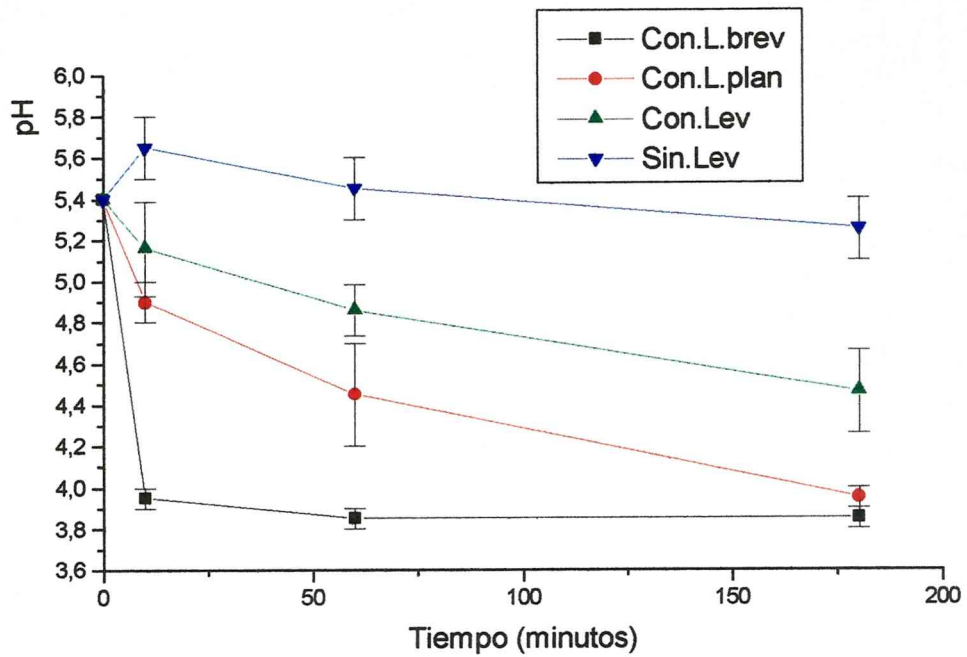


FIGURA 10: pH para masas con y sin levadura y cepas puras - Valores promedio para tres y dos determinaciones respectivamente

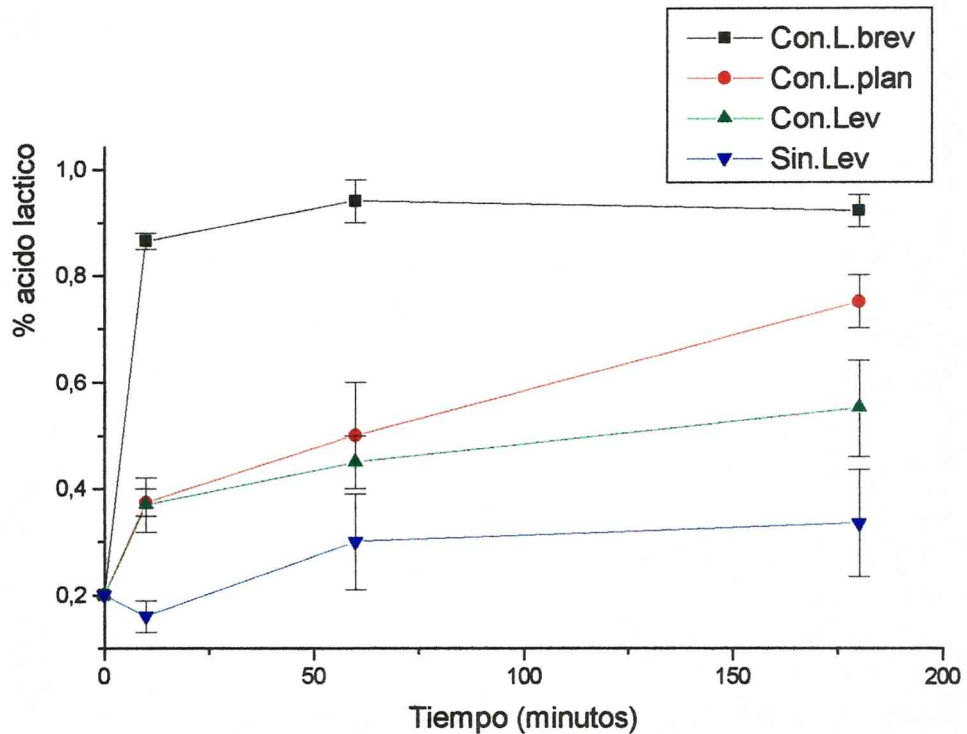


FIGURA 11: Acidez en g % de ácido láctico en masas con y sin levadura y cepas puras - Valores promedio para tres y dos determinaciones respectivamente

### 5.2.2.- Cambios en los valores de recuento durante el proceso

Como se mencionó anteriormente, se esterilizaron las soluciones de sal y azúcar, se trató con radiación microonda la harina a utilizar en estos ensayos y se prepararon suspensiones de *S. cerevisiae*, *L.plantarum*, *L. brevis* y *B.subtilis*, que se incorporaron a distintas masas.

La Figura 12 muestra la evolución de los microorganismos en masas preparadas con *L. brevis* en ausencia y en presencia de *S.cerevisiae*. La curva de crecimiento de *L.brevis* en masas sin levadura es semejante a la que se observa para el mismo microorganismo en presencia de *S. cerevisiae*, pero con valores de recuento algo mayores, lo que indicaría una cierta inhibición o antagonismo frente a la levadura. *S.cerevisiae* en masas que contienen *L.brevis* produce una curva de crecimiento típico pero con valores de recuento no demasiado altos. Este resultado también estaría indicando algún tipo de competición o afectación de su crecimiento.

En la Figura 13 se observan los cambios en los recuentos microbiológicos de masas inoculadas con *L.plantarum* solo y en presencia de *S.cerevisiae*. Los resultados de los recuentos a lo largo del proceso de panificación, para *L.plantarum* en ausencia y en presencia de levadura revelan valores mas altos que para *L. brevis* y un incremento notable en la fermentación final. Cuando se siembra la masa con *L.plantarum* solo, se obtiene una curva de crecimiento con valores de recuento mayores que cuando se inocula en presencia de levadura pero con diferencias menos marcadas que las observadas para *L.brevis*. La curva de crecimiento de *S.cerevisiae* en presencia de *L.plantarum* muestra la misma tendencia que frente a *L.brevis*, pero con valores de recuento más altos. Por lo tanto, en estas masas inoculadas con *L.plantarum* y levadura se advierte muy poco efecto antagónico, lo que revelaría mayor compatibilidad entre ambas especies.

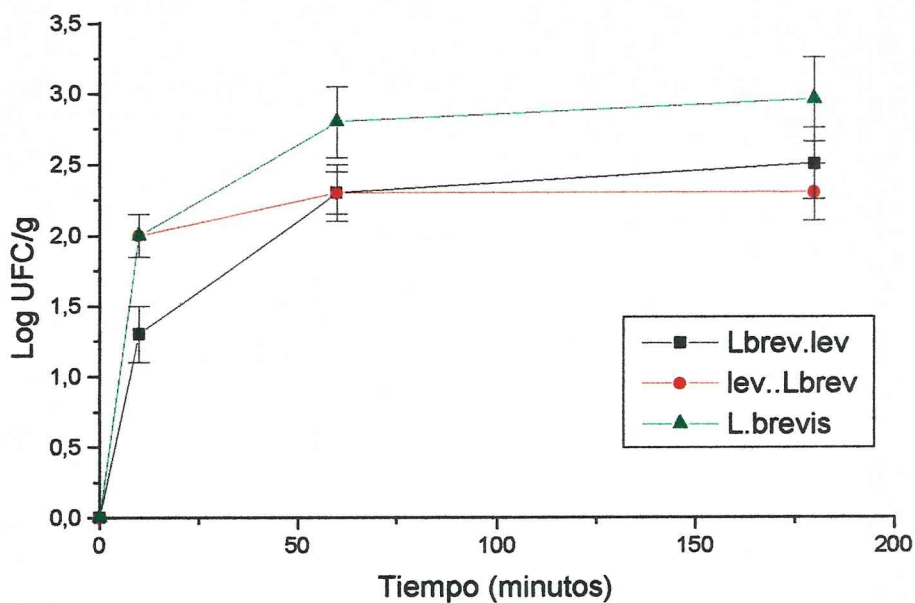


FIGURA 12: Cambios de los recuentos microbiológicos de masas inoculadas con: a) *Lactobacillus brevis* (sin levadura), b) *S. cerevisiae* más *Lactobacillus brevis*. (valores promedio de tres determinaciones)

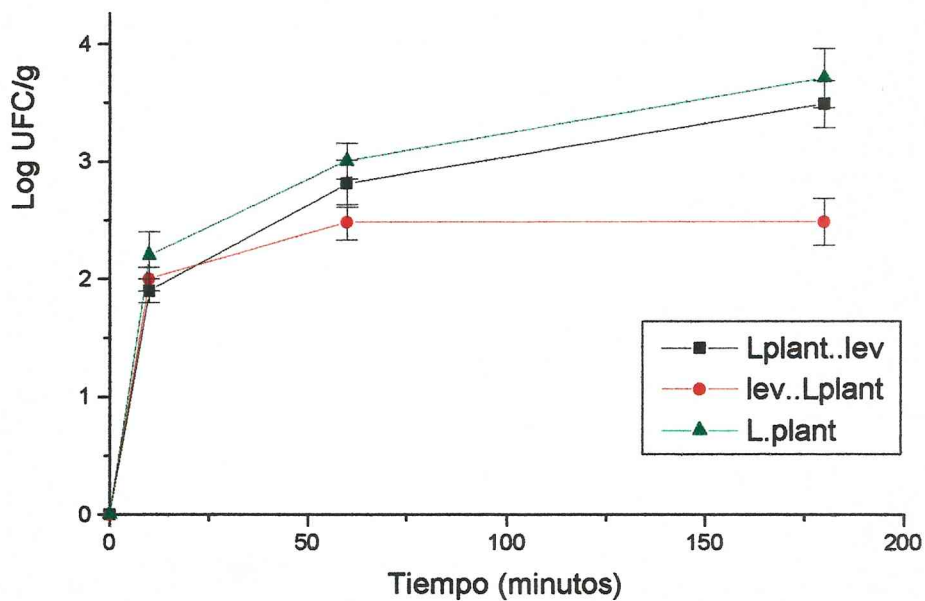


FIGURA 13: Cambios de los recuentos microbiológicos de masas inoculadas con: a) *Lactobacillus plantarum* (sin levadura), b) *S. cerevisiae* más *Lactobacillus plantarum*. (valores promedio de tres determinaciones)

### 5.2.3.- Valores de pH frente a soluciones de glucosa al 10 % p/v

Para lograr un mejor conocimiento de la levadura prensada comercial y de las dos especies de lactobacilos más representativos de las masas, se ha considerado de interés investigar la capacidad fermentativa frente a soluciones de glucosa al 10 % p/v, midiendo las variaciones del pH después de haber transcurrido el tiempo correspondiente a la fermentación final y registrando sólo los incrementos o descensos respecto al pH inicial.

La Tabla XVII refiere los resultados obtenidos en este estudio comparativo. De acuerdo con estos datos, en las mismas condiciones, *L. brevis* ocasiona la más alta acidificación al tiempo correspondiente a la fermentación final, *L. plantarum* también origina descensos en más de una unidad de pH y *S. cerevisiae* produce una caída de aproximadamente la mitad de unidades pH, considerando los valores promedio.

TABLA XVII: Descensos de pH registrados en un cultivo de microorganismos, obtenido a partir de una colonia (extraída de un cultivo joven) sembrada en el medio 1-1-1, en el que se utilizó glucosa como fuente de carbono

	Descenso en unidades de pH en 180 minutos		
	máximo	mínimo	$\bar{x}$ (*)
<i>S.cerevisiae</i>	0,95	0,20	0,65
<i>L.brevis</i>	1,93	1,33	1,58
<i>L.plantarum</i>	1,90	0,50	1,18

(\*) Tomado para 5 determinaciones.

### 5.2.1.- Valores de pH, acidez titulable y volumen de las masas preparadas con mezclas de microorganismos.

En la Tabla XVIII se comparan los valores de pH y acidez que se producen cuando se preparan las masas empleando levadura comercial y lactocilos, después de haber transcurrido el tiempo correspondiente a la fermentación final. Los resultados que se muestran indican que los valores son mucho más estables que los indicados para las soluciones de glucosa al 10 % p/v, no observándose diferencias de pH y acidez final demasiado marcadas cuando se incorporan *L. plantarum* o *L. brevis* a las masas preparadas con levadura. En cambio resulta bastante notable el incremento de volumen de la masa que se produce cuando se incorpora *L. plantarum* en lugar de *L. brevis*.



TABLA XVIII : Descensos de pH, aumentos de acidez valorable e incrementos de volumen registrados en masas preparadas con *L.plantarum* y *S.cerevisiae* y en masas elaboradas con *L.brevis* y *S.cerevisiae*, en 180 minutos de fermentación.

Cultivos	pH	Acidez en g % de ác.láctico	Incremento de volumen ( V - V <sub>o</sub> ) ml
<i>L.plantarum</i> + <i>S.cerevisiae</i>	3,95 ± 0,05	0,75 ± 0,05	130 ± 10 (*)
<i>L. brevis</i> + <i>S.cerevisiae</i>	3,85 ± 0,05	0,92 ± 0,02	50 ± 5 (*)

(\*) Valores promedio correspondientes a tres determinaciones.

Los resultados que se muestran en las Figuras 12 y 13 y en las Tablas XVII y XVIII indican que las dos especies de *Lactobacillus* agregadas a las masas de panadería en presencia de levadura, producen efectos beneficiosos dado que mejoran la acidificación y la capacidad de levado. Respecto a la acidez que estos microorganismos originan, se observa que frente a soluciones de glucosa las diferencias son bastante notables pero en las masas se advierte que los valores que se alcanzan en la fermentación final son prácticamente iguales.

Por otro lado, si se analizan las curvas de crecimiento, las posibilidades de interacción y las capacidades de levado frente a *S. cerevisiae*, se detectan efectos más positivos para *L.plantarum* que para *L.brevis*.

Además debe tenerse en cuenta que esta especie es homofermentativa, es decir, que por si sola no es capaz de levar la masa, pero los resultados indican que puede crecer muy bien en presencia de levadura, que es la que produce el CO<sub>2</sub> necesario, por lo que resulta una asociación compatible y beneficiosa en todos los aspectos.

Distintas investigaciones han demostrado que la fermentación conduce al levado de la masa, que mejora el volumen de pan y particularmente a la acidificación de la masa, que mejora el aroma (Collar Esteve y col.1994 a y b) Ambas funciones fueron también puntualizadas y relacionadas con la microflora de las masas por otros autores (Kline y Sugihara 1971, Sugihara y col. 1971, Galli y Ottogalli 1973, Sugihara 1977, Faid y col. 1993 y 1994)

Collar Esteve y col. (1994 a) realizaron un estudio sistemático investigando la acidificación y la calidad panadera de masas preparadas con harina de trigo y distintas proporciones de starters bacterianos. Al igual que Brümmer y Fisher (1990) determinaron que la acidificación de la masa influye sobre la calidad del pan pero, como se mencionó anteriormente, estos autores establecieron que los agregados de inóculos de masas madre fueran de 7,5-10

% p/p de manera de obtener descensos de pH hasta 3,5-4, a fin de lograr aroma y sabor aceptables.

Por otro lado, Collar Esteve y col. (1994 b) demostraron que cuando los cultivos de levaduras y bacterias se usan individualmente, se obtienen panes con sabor suave o débil, mientras que cuando se emplean cultivos combinados se desarrolla un típico y acabado sabor a pan. Esto sugiere un rol de asociación entre bacterias y levaduras en la fermentación y sustenta la hipótesis de que la mezcla favorece el desarrollo del característico sabor a pan, haciéndolo más pronunciado.

Spicher y col. (1981 y 1982) también recomendaron una acidificación controlada y consideraron que una excesiva acidificación dificulta la producción de volúmenes altos y produce un aroma de pan pungente que no es aceptado por el consumidor.

Boraam y col. (1993) estudiaron mezclas de levaduras y bacterias lácticas con la finalidad de lograr la acidificación y el levado típicos del pan de Marruecos en tiempos más cortos.

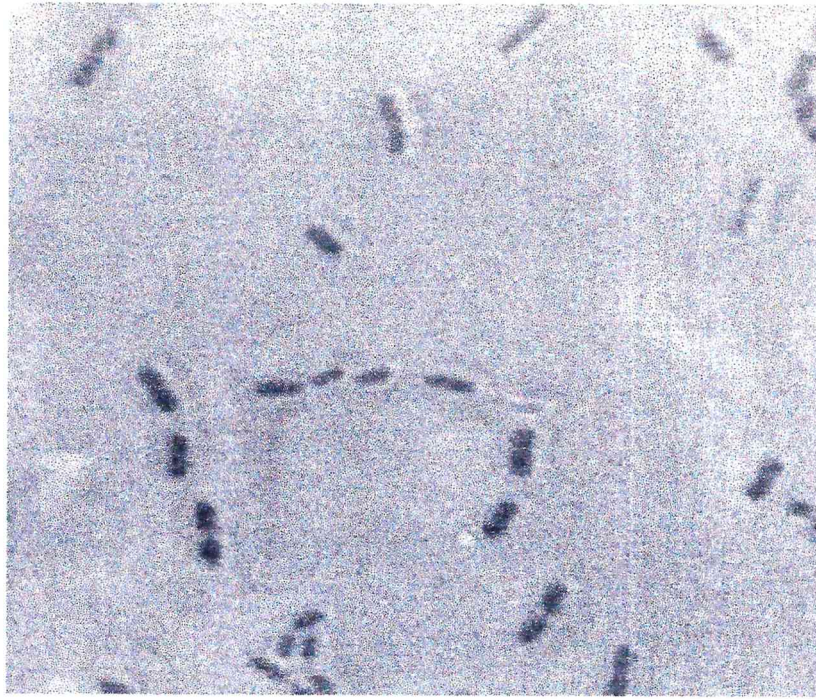
Faid y col. (1994) sostuvieron que el método antiguo de mantener una porción de masa en fermentación hasta el día siguiente e incorporarla a las nuevas masas, favorece precisamente el desarrollo de un característico aroma ácido y un sabor agradable, debido a la actividad conjunta de levaduras y bacterias acidolácticas.

En el método de panificación tradicional argentino, no se utilizan inóculos de masas madres, ni se emplean starters, pero los procesos son largos y las masas se mantienen en fermentación varias horas y a veces hasta el día siguiente.

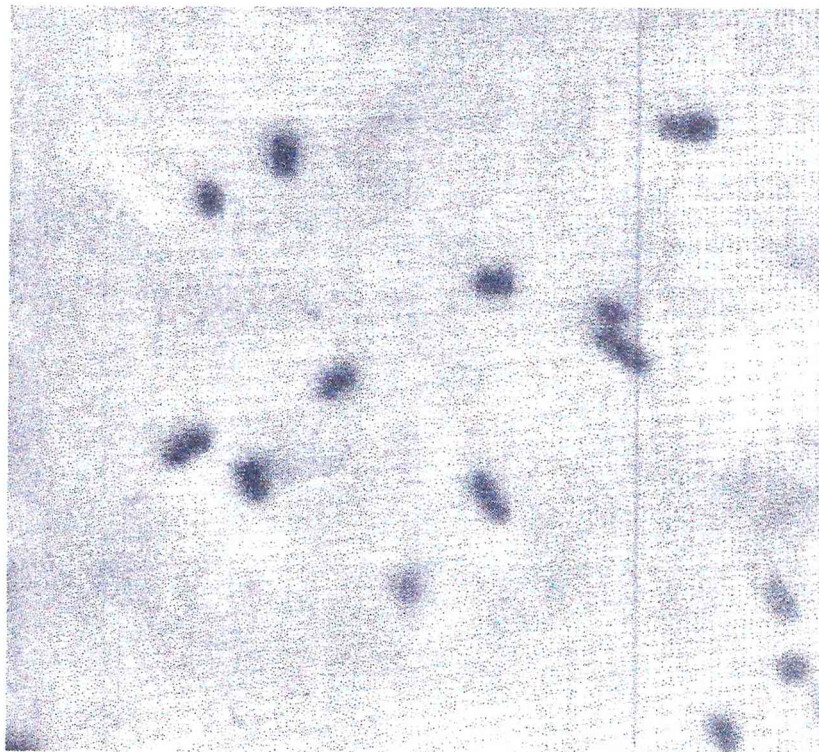
La fotografía 3 muestra las características morfológicas de *Lactobacillus plantarum var. plantarum*. En ella se observan bacilos medianos agrupados de a pares o dispuestos en cadenas cortas. Su forma es similar a la de *Lactobacillus casei sp casei*, pero se diferencia de este microorganismo porque generalmente desarrolla en cadenas de bacilos largos, particularmente en medios adversos (Pederson 1971)

En la fotografía 4 podemos observar las características morfológicas de *Lactobacillus brevis*, considerada como una de las especies heterofermentativas más comunes. En ella se destacan cocobacilos o bacilos muy cortos, dispuestos de a pares o aislados, aunque también estos organismos pueden agruparse en cadenas como otras especies de este género, ocurriendo ello principalmente en medios ácidos o cuando el crecimiento se produce a altas temperaturas (Pederson 1971)

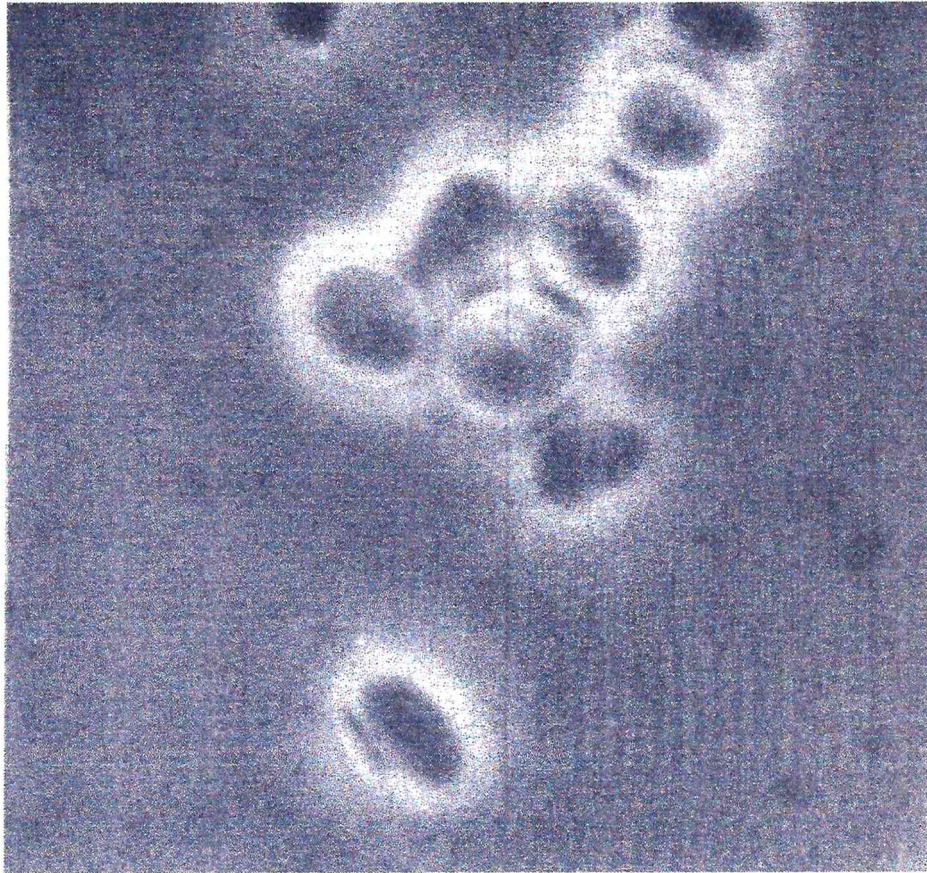
En la fotografía 5 se presentan las células características de la levadura *S.cerevisiae*, aisladas de una masa de panificación. Dentro de las formas agrupadas se observan algunas células en división (Pederson 1971).



Fotografía 3: Características morfológicas de *L. plantarum* var. *plantarum*  
( aumentada aproximadamente 2800 x )



Fotografía 4: Características morfológicas de *L. brevis*.  
( aumentada aproximadamente 2800 x )



Fotografía 5: Características morfológicas de *S. cerevisiae* ( aumentada aproximadamente 2800 x )

En la parte inferior se observa una bacteria, presumiblemente perteneciente a especies lácticas, junto a una célula de levadura.

## 6.- Calidad de los panes

Teniendo en cuenta que los agregados de levaduras y bacterias en distintos porcentajes, modifican las propiedades funcionales de las masas y causan efectos mejoradores sobre su plasticidad y sobre la calidad global de los panes (Collar Esteve 1994 a), que el gas desarrollado fundamentalmente por efectos de la levadura produce una textura más abierta, mientras que los ácidos acético y láctico formados por las bacterias acidolácticas juegan un rol importante en el sabor (Boraam y col. 1993), que los cambios de los mono y disacáridos de las masas también influyen sobre las características organolépticas y estructurales del pan (Barber y col. 1989) y pueden modificar la elasticidad de la miga y el sabor de los productos de panificación del centeno (Spicher y col. 1981 y 1982), en este trabajo se evaluaron sensorialmente los panes correspondientes a los distintos procesos de panificación, realizados con y sin levadura, empleando materias primas sin tratamiento de esterilización, como así también los correspondientes a procesos efectuados con ingredientes estériles y agregados de *L.plantarum*, *L.brevis* y *B.subtilis*, en presencia de levadura.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XIX e indican que los panes elaborados con *L.plantarum* y con *L.brevis* presentaron mejor textura, mayor esponjosidad y resultaron más livianos. El pan preparado a partir de masas inoculadas con *L.plantarum* y levadura mostró los valores más altos en volumen y en altura de la rebanada en su parte central, en tanto que la densidad y la relación corteza-miga revelaron los valores más bajos. Se observó una distribución más uniforme de los alvéolos y aunque los panes mostraron una coloración ligeramente parda, el aroma resultó más intenso y la aceptación global fue la más satisfactoria. Los mismos caracteres exhibieron los panes preparados a partir de masas que contenían *L.brevis* y levadura pero el volumen resultó algo menor y los caracteres sensoriales menos manifiestos. Estos resultados indican que este microorganismo también podría incorporarse a las masas a fin de mejorar las propiedades físico-químicas de las mismas y los caracteres organolépticos del pan.

El pan elaborado a partir de la masa con levadura y *Bacillus subtilis*, fue el que presentó menor volumen y además forma aplanada o achatada y poco atractiva. La miga resultó gomosa y elástica, los alvéolos pocos y compactos y el color no fue muy oscuro pero tendió más hacia un tono amarillo. Estas propiedades pueden relacionarse con la capacidad de producir  $\alpha$ -amilasa que presenta *B.subtilis* (Deak y Timar 1988, Dettori-Campus y col. 1992) que origina una masa y un pan de características similares a las que resultan cuando se emplea harina de trigo germinado. Según Pomeranz (1985 b) la acción de la  $\alpha$ -amilasa sobre el almidón durante el proceso de panificación da origen a un complejo de dextrinas y un levado pegajoso, considerándose este el efecto más perjudicial del trigo germinado. Por otro lado y de acuerdo con esta bibliografía, Chamberlain y col. (1983) detallaron la naturaleza de los cambios en pegajosidad, elasticidad, comprensibilidad y densidad de la miga como resultado de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa. El efecto global se manifiesta como una solidificación de la miga y un aumento de la densidad del producto. Banasik y

col. (1978) demostraron que estas modificaciones inciden sobre el peso del grano, sobre la capacidad de absorción de agua de la harina y sobre el volumen de pan, mientras que Bushuk (1975) mostró datos de los efectos sobre la molienda, el color de la harina y el volumen de pan.

Por otro lado, la presencia de un trigo germinado en la harina siempre se detecta por una modificación del Falling Number, un aumento de  $\alpha$ -amilasa y una disminución del potencial de la harina para la panificación (Moot y Every 1990).

Además para el caso de *B. subtilis* también se encontró que la actividad proteolítica era notable. Lógicamente la hidrólisis de proteínas produjo un aumento de péptidos y aminoácidos, una consecuente pérdida de la insolubilidad y un cambio en las características de las proteínas.

También cabe mencionar que los caracteres observados por el agregado de *B. subtilis* son similares a los que se detectan cuando quedan esporas de este microorganismo en el pan. Estas esporas provenientes de la harina, son resistentes al calor y quedan en la miga después del horneado si la temperatura del centro de la pieza no sobrepasa los 100 °C, germinando con cierta rapidez cuando el pan se almacena a una temperatura mayor de 20 °C. Como vimos anteriormente, en estas condiciones se produce el pan llamado viscoso o filante que tiene una miga blanda, untuosa, coloreada más o menos intensamente de amarillo, que al cortarlo forma filamentos mucilaginosos y elásticos (Jay 1981)

Por lo tanto, de acuerdo con estos resultados podemos deducir que es deseable una ligera actividad amilolítica y proteolítica de los microorganismos pero que es altamente perjudicial una acción intensa y prolongada. Es sabido que el agregado de  $\alpha$ -amilasas de cereales, en forma de harina de malta o de  $\alpha$ -amilasas fúngicas o bacterianas, ya sea aisladas o través de cultivos, se hace con la finalidad de mejorar el sabor del pan, el color de la corteza y sobre todo la blandura y color de la miga, pero debe tenerse en cuenta que estos efectos pueden revertirse cuando la cantidad agregada es excesiva.

Por lo dicho anteriormente, podemos concluir, que cuando se utilizan microorganismos asociados a la levadura de panadería, para lograr efectos positivos sobre la calidad del pan, debe considerarse como condición importante de los mismos, que presenten capacidad amilolítica y proteolítica débil y controlable.

Los resultados de este trabajo muestran que los lactobacilos estudiados cumplen con esta condición pero además son capaces de producir la acidez necesaria de la masa, mejoran el levado y dan origen a panes que presentan atributos sensoriales muy aceptables.

La especie homofermentativa *L. plantarum* asociado a la levadura de panadería, dió origen a masas con mayor capacidad de levado que la especie heterofermentativa *L. brevis*, por lo que se deduce que la capacidad de formar CO<sub>2</sub> por acción de las bacterias, no tiene tanta incidencia sobre el volumen de levado.

Las características de la masa, tales como pH bajo, mayor acidez valorable e incremento de volumen durante la fermentación, son las que mayormente se reflejaron sobre la calidad de los panes.

TABLA XIX : Características de los panes elaborados con levadura comercial y con microorganismos.

Microorganismo	c/ lev	<i>L.p</i> - lev	<i>L.b</i> -lev	<i>B.s</i> -lev
Volumen del pan ( ml /100 g )	487±20	514±20	490±20	380±20
Altura de la rebanada (cm)	8±0,5	8,5±0,5	8,2±0,5	6.5±0,5
Relación corteza/ miga	0,63	0,47	0,50	0,67
Densidad (g/ml)	0,26	0,25	0,27	-
Aspecto externo	normal	normal	normal	achatado
Aspecto de la miga:	esponjosa	> esponjosidad	algo <	gomosa
Alvéolos	normales no muy uniformes	más grandes y uniformes	más grandes y uniformes	pocos y compactos
Color	blanco	ligeramente pardo	algo <	intermedio
Aroma	típico-débil	típico-más fuerte	típico-fuerte	no típico
Aceptación global	buena	buena	buena	no aceptado

Referencias : > : mayor ; < : menor

c/ lev : con levadura

*L.b* -lev: con *L.brevis* y levadura

*L.p*- lev : con *L.plantarum* y levadura

*B.s*-lev: con *B.subtilis* y levadura.

En el pan sin levadura sólo se midió el volumen. Los valores promedios correspondieron a  $50 \pm 4$  ml.

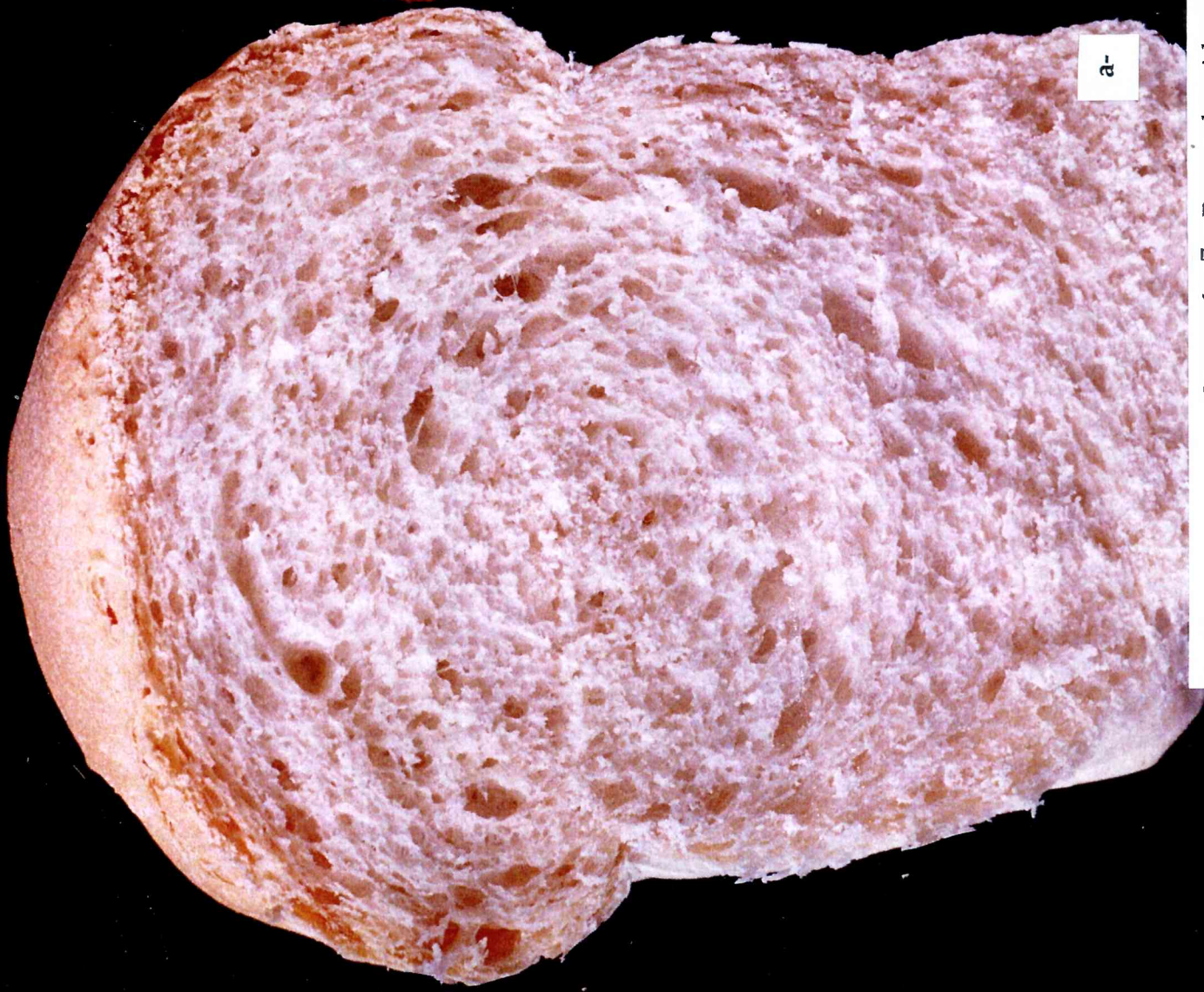
Las fotografías 6 y 7 muestran las características de algunos de los panes obtenidos. En la fotografía 6 pueden observarse comparativamente la altura de la rebanada, el espesor de la corteza y el aspecto de la miga en cuanto a tamaño y uniformidad de los alvéolos, para el pan elaborado sólo con levadura comercial, para el preparado con levadura comercial y *L. brevis* y para el fabricado con levadura comercial y *L. plantarum*.

En la fotografía 7 se comparan los caracteres de la miga, textura más o menos abierta, color, tamaño y distribución de los alvéolos para un pan elaborado con *L. plantarum* y otro con *L. brevis*, ambos con levadura comercial.





Fotografía 6: Panes obtenidos con agregados de microorganismos  
a- Con *S. cerevisiae*, b- Con *S. cerevisiae* y *L. brevis*,  
c- Con *S. cerevisiae* y *L. plantarum*.



a-



b-

Fotografía 7: Panes obtenidos con agregados de levadura y lactobacilos  
a- Con levadura y *L. plantarum*, b- Con levadura y *L. brevis*

## CONCLUSIONES

La producción de pan, sin el agregado de masas madre, es la práctica industrial más utilizada en nuestro país.

En la bibliografía internacional, las publicaciones sobre masas de panadería preparadas con harina de trigo, no son infrecuentes (Barber y col. 1983, 1985 a y b, 1986, 1987, 1988, 1989, 1991; Collar y col. 1991; Collar Esteve 1994 a y b), pero tampoco demasiado abundantes.

El hecho de que las características de la microflora, su evolución en las distintas etapas y sus efectos sobre las masas, dependen fundamentalmente del procedimiento utilizado en la panificación (Bourgeois y Larpent 1995) limita o anula el valor de la información, sino se refiere específicamente al proceso desarrollado.

En este caso, precisamente, no se ha encontrado ninguna publicación que se refiera a masas de harina de trigo preparadas sin masas madre o sin starters, ni tampoco estudios referentes a los cambios que ocurren en las distintas etapas de un proceso estandarizado de panificación.

De acuerdo con los resultados de este trabajo y teniendo en cuenta la información básica obtenida, podemos concluir que la flora microbiológica de las masas de panadería, proviene fundamentalmente de las harinas. Este hecho se pone de manifiesto sobre todo en las masas preparadas sin levadura. Sin embargo, cabe destacar, que en las masas elaboradas con levadura, no se anula la posibilidad de desarrollo de la flora bacteriana y ésta aparece, aunque en menor proporción, como microflora acompañante. Esto demuestra que en el sistema fermentativo de las masas, es posible la co-existencia entre bacterias, sobretodo lácticas y levaduras.

La alta proporción de ambas especies sugiere que tanto las bacterias lácticas como las levaduras, están involucradas en la fermentación. Este hecho se confirma al demostrar los efectos de estos microorganismos cuando se inoculan en masas estériles.

Las especies *Lactobacillus plantarum* var. *plantarum* y *Lactobacillus brevis*, en las masas preparadas con levadura y en masas sin agregado de levadura, pero con crecimiento paralelo de levaduras naturales, resultaron las especies acidolácticas más activas.

Los lactobacilos presentaron una actividad amilolítica, proteolítica y fermentativa variable, según la especie y en algunos casos, diferente a los 180 minutos y a las 24 horas.

Durante el proceso, la capacidad para producir descensos de pH y desarrollo de acidez valorable fue parecida para las dos especies de lactobacilos mencionadas, pero *L. plantarum* mostró mayor compatibilidad y posibilidad de crecimiento, en presencia de levadura, que *L. brevis*.

Por otro lado, los recuentos de *S. cerevisiae* durante las etapas del proceso, fueron ligeramente más altos y la especie mostró mayor capacidad para el levado de la masa en presencia de *L. plantarum* que asociada a *L. brevis*.

Las mezclas de lactobacilos y levadura pueden modificar la esponjosidad, el aroma, ligeramente el color y el volumen de los panes, dependien-

do estas características de las especies y de la proporción de dichos microorganismos presentes en el sistema.

El ligero aumento del color de los panes y la tendencia hacia un tono pardo o marrón de los panes elaborados con dichas mezclas, sugiere la posibilidad del empleo de *L. plantarum* y *L. brevis* como starters en masas de panes negros.

La información obtenida es prometedora, confirma la diferencia con los resultados logrados en otros procesos y pone en evidencia la necesidad de ampliar el estudio de masas de panadería de nuestro país, dada la naturaleza de los microorganismos típicos involucrados y su diferente adaptación en los distintos sistemas.

Por otro lado, abre un campo de investigación importante en lo referente a procesos de panificación de panes elaborados con mezclas de harinas, especialmente panes negros, empleando estos microorganismos con la finalidad de mejorar las propiedades funcionales de las masas y las características organolépticas del pan.

Sería interesante llegar a la comprobación de que el desarrollo de técnicas nuevas, empleando cultivos bacterianos, además de la levadura como agentes de fermentación, no sólo produce efectos beneficiosos sobre el color, el aroma o la textura de los panes, sino que aumenta su período de conservación (por producción de antifúngicos) o mejora el comportamiento de las masas en la congelación.

También es interesante destacar que el estudio de los aspectos microbiológicos, bioquímicos y tecnológicos de las masas de panadería, tiende hacia un solo propósito, que es mejorar la calidad del pan.

## APENDICE

## Medios de cultivo utilizados

### Agua fosfatada (Agua tamponada con fosfato para diluciones)

(Butlerfield, 1932)

Solución stock de tampón fosfato: Se disuelven 34 g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  en 500 ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 7,2 con NaOH 1 N y se diluye hasta 1 litro con agua destilada.

Se esteriliza la solución en autoclave 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$  y se conserva en refrigerador hasta su uso. El pH final debe ser 7,0.

Agua tamponada para diluciones: Se añaden 1,25 ml de la solución stock de tampón fosfato en 1 lt. de agua destilada. Se distribuye en frascos o tubos en volúmenes predeterminados de tal forma que el volumen después de la esterilización en autoclave sea  $\pm 2\%$  del deseado.

### Agar-manitol- sal común-rojo de fenol

Composición (g/litro)

Peptona 10,0; extracto de carne 1,0; cloruro sódico 75,0; D (-) manitol 10,0; rojo de fenol 0,025; Agar-agar 12,0.

Preparación

Se disuelve 108 g/ litro, se esteriliza en autoclave ( 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ ) y se vierte en placas.

pH:  $7,4 \pm 0,1$ .

Las placas con medio de cultivo son claras y de color anaranjado.

Incubación: hasta 3 días a  $37^\circ\text{C}$ .

### Agar MRS (Agar para Lactobacillus seg. DE MAN, ROGOSA Y SHARPE)

Composición (g/litro)

Se disuelve 62 g/ litro y esteriliza en autoclave ( 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ ). Se vierte en placas.

pH:  $6,5 \pm 0,1$ .

Las placas con medio de cultivo son claras e incoloras.

Incubación: hasta 3 días a  $37^\circ\text{C}$  o 5 días a  $30^\circ\text{C}$  en atmósfera de  $\text{O}_2$  reducida, enriquecida con  $\text{CO}_2$ .

**Agar Baird Parker (Agar selectivo para estafilococos según Baird- Parker)**Composición (g/litro)

Peptona de caseína 10,0; extracto de carne 5,0; extracto de levadura 1,0; piruvato sódico 10,0; glicina 12,0; cloruro de litio 5,0; agar-agar 15,0.

Aditivos: emulsión de yema de huevo - telurito de potasio 50 ml.

Preparación

Se disuelve 58g en 0,95 litros, se esteriliza en autoclave (15 min. a 121° C) se enfría a 45-50° C, se añade 50 ml de emulsión yema de huevo -telurito y se vierte en placas.

pH:  $6,8 \pm 0,2$ .

Incubación: desde 24 hasta 48 horas a 37 °C.

**Agar furazolidina (FTO)**Composición

Peptona 10 g; extracto de levadura 5 g ; cloruro sódico 5 g ; glucosa 1 g; agar-agar 12 g; Solución de furazolidina 0,02 %.

Preparación

Se disuelve en 1 litro de agua destilada, se esteriliza en autoclave ( 15 minutos a 121° C) se deja enfriar y se agrega solución de furazolidina al 0,02 % y se vierte en placas.

pH:  $7,0 \pm 0,1$ .

Incubación: 24-48 horas a 35 °C.

**Medio para movilidad**Composición

Extracto de carne 0,3 g.; peptona 1 g.; cloruro sódico 0,5 g.; agar-agar 0,5 g.

Preparación

Se añaden los ingredientes a 100 ml de agua destilada. Se mezcla y calienta ebullición hasta disolución completa. Se enfría a 50-60 °C. Después de la esterilización el pH debe ser  $7 \pm 0,2$ . Se distribuye en tubos aproximadamente 8 ml. Esterilizar en autoclave ( 15 min. a 121° C). Se siembra por punción.



### Utilización aeróbica y anaeróbica de la glucosa

#### Composición (g/litro)

Triptona 10; extracto de levadura 0,1; glucosa 1; purpura de bromocresol 0,004; agar- agar 0,2.

#### Preparación

Se coloca en tubos 10 ml y se autoclava 20 min a 115 °C . Los tubos son fuertemente inoculados con ansa de punta en aguja y uno de cada par de tubos es cubierto con una capa de 1-2 cm de parafina líquida estéril.

Posteriormente son incubados a 37 °C por 5 días.

### Caldo ensayo para arginina-dehidrolasa

#### Composición

Peptona de carne 1,25 g.; extracto de levadura 0,75 g.; D(+) glucosa 0,25 g.; púrpura de bromocresol 0,004 g..

#### Preparación

Se disuelve y se lleva con agua destilada a 250 ml. Dejar 50 ml para control y agregar L-arginina monohidrato a razón de 5g/l. Distribuir en tubos 0,25 ml. pH:  $6,7 \pm 0,1$ . Se esteriliza en autoclave ( 15 min. a 121° C). Tanto el medio de cultivo completo como los tubos de control se siembran con el cultivo puro en cuestión. Para lactobacilos se recomienda cubrir con parafina líquida estéril. Incubación: Hasta 4 días a temperatura óptima. Durante las primeras 6-8 horas el medio es de color amarillo intenso. Si se degrada la arginina el medio se torna violeta. Los cultivos control deben permanecer amarillos sino el ensayo no es válido.

### Caldo almidón

#### Composición (g/litro)

Triptona 0,5; extracto de levadura 0,3; almidón 1

#### Preparación

Se disuelve en 100 ml de agua destilada. Comprobar el pH: 7- 7,2 y se esteriliza en autoclave (15 min. a 121° C). El almidón se agrega al 1 % estéril.

Se incuba a 32 °C durante 48-72 hs.

**Reducción de nitratos**Composición (g/litro)

Peptona de carne 8,6; cloruro sódico 6,4; nitrato potásico 1,5.

Preparación

Se disuelve 16,5 g por litro del medio, se fracciona en tubos y se esteriliza en autoclave (15 min. a 121° C). pH: 7,2 ± 0,1. El caldo preparado es claro e incoloro.

Incubación: 12-24 horas a temperatura óptima. A continuación se investiga con los correspondientes reactivos, la degradación de nitrato con reactivo de Griess-Ilosva.

**Agar gelatina**Composición (g/litro)

Gelatina 3; cloruro sódico 1; agar-agar 1,5.

Preparación

Se disuelve en 100 ml de agua destilada. Se comprueba el pH: 7 - 7,2 y se esteriliza en autoclave (15 min. a 121° C). Se distribuye en placas. Se inoculan las placas por estría y se incuban a 32 °C durante 48-72 hs. Para leer los resultados, se inundan las placas con 8-10 ml de una solución de Cl<sub>2</sub>Hg . Reacción positiva se manifiesta por un aclaramiento del medio en las proximidades de la línea de crecimiento.

**Caldo MR-VP (Caldo rojo de metilo -Voges-Proskauer)**Composición (g/litro)

Peptona tamponada 7; D(+) glucosa 5; tampón de fosfatos 5.

Preparación

Disolver 17 g por litro, distribuir en tubos a razón de 5 ml y esterilizar en autoclave (15 min. a 121 °C). pH 6,9 ± 0,1.

Se siembran 2 tubos de Caldo MR-VP con el cultivo puro de 18-24 hs.

Incubación: 4 días a 37° C.

Se agregan los reactivos para rojo de metilo y Voges-Proskauer directamente a una alícuota incubada antes de intentar la interpretación.

**Agar citrato de Simmons**Composición (g/litro)

Dihidrogenofosfato amónico 1; hidrogenofosfato dipotásico 1; cloruro sódico 5; citrato sódico 2; sulfato de magnesio 0,2; azul de bromotimol 0,08; agar-agar 13.

Preparación

Se disuelven 22,5 g por litro, esterilizar en autoclave (15 min. a 121° C) y se preparan tubos inclinados, o bien se vierte en placas.

pH 6,6 ± 0,1.

Las placas con medio de cultivo o los tubos inclinados son claros y de color verde.

**Medio basal inorgánico (BIM B)**Composición (g/litro)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,8; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2; CaSO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 0,05; MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O 0,5; FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,01; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 1.

Preparación

Se disuelve en 1000 ml de agua destilada. Se esteriliza en autoclave (15 min. a 121° C). Se distribuye en placas. Se inoculan las placas por estría y se incuban a 32 °C durante 48-72 hs.

**Fermentación de carbohidratos para Lactobacillus sp.**Composición

Medio base: Peptona 2,5 g;; extracto de levadura 1,25; Tween 80 0,25; PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub> 0,5 g;; acetato de sodio 1,25 g;; SO<sub>4</sub>Mg, 7 H<sub>2</sub>O 0,025 g;; sulfato de manganeso 0,0125 g.; citrato de amonio 0,5 g .

Indicador: Púrpura de bromocresol al 1 %.

Azúcares utilizados: arabinosa, galactosa, manosa, melibiosa, lactosa, cellobiosa, salicina, sorbitol, trehalosa, xilosa, manitol, glucosa, maltosa, ribosa, rafinosa, ramnosa, fructuosa, amigdalina.

Preparación

Se reparte el medio base en tubos (2,25 ml) y se esteriliza en autoclave a 110 °C durante 10 min.

Se inoculan los cultivos en el medio basal recomendado, que es el MRS caldo con glucosa y extracto de carne omitidos, usando microorganismos de crecimiento vigoroso. Y se agregan los azúcares en alícuotas de 0,25 ml en condiciones estériles (soluciones de azúcares al 10 % p/v).

### **Producción de ácidos a partir de azúcares para *Micrococcus* sp.**

#### Composición

Medio base: Fosfato diácido de amonio 0,1 g; cloruro potásico 0,02 g; MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0,02 g; extracto de levadura 0,1 g; púrpura de bromocresol 0,004.  
Azúcares utilizados: manosa, lactosa, galactosa y glicerol.

#### Preparación

Medio base: Se disuelve en 100 ml de agua destilada. Repartirlo en tubos pequeños (2 ml), se esteriliza en autoclave (15 min. a 121 °C), se siembra con el cultivo puro de 18-24 hs objeto de investigación y se agrega 0,1 ml de solución de azúcar al 10 %. Incubar 35-37 °C durante 7 días.

### **Producción de acetoína**

Se siembra en caldo RM-VP 2,5 ml del cultivo y se agrega 0,5 ml de naftol en etanol al 5 % y 0,2 ml de solución de hidróxido de potasio al 40 %. Agitar suavemente. Descansar 10 a 15 min.

### **Agar caseína**

#### Composición

Caseína 3 g; cloruro sódico 1 g; agar -agar 1,5 g.

#### Preparación

Se disuelve en 100 ml de agua destilada. Se comprueba el pH: 7 - 7,2 y se esteriliza en autoclave (15 min. a 121° C). Se distribuye en placas. Luego se inoculan las placas por estría y se incuba a 32 °C durante 48-72 hs.

### **Agar gluten**

#### Composición

Gluten 0,3 g; cloruro sódico 1 g; Agar -agar 1,5 g.

Preparación

Se disuelve en 100 ml de agua destilada. Se verifica el pH: 7 - 7,2 y se esteriliza en autoclave (15 min. a 121° C). Se distribuye en placas. Se inoculan las placas por estría y se realiza la incubación a 32 °C durante 48-72 hs.

**Medio 1-1-1**Composición

Lactosa 10 g; cloruro sódico 10 g; extracto de levadura 10 g.

Preparación

Se disuelve en 1000 ml de agua destilada. Se regula el pH a 7 - 7,2. Se distribuye en placas. Incubación : a 32 °C durante 48-72 hs.

**Agar tributirina (Agar glicerina tributirato)**Composición (g/litro)

A partir de la degradación de la tributirina se producen halos de aclaramiento alrededor de las colonias, en contraste con el resto de medio de cultivo que permanece turbio. El medio debe presentarse con aspecto de emulsión turbia homogénea.

Peptona de carne 2,5 g; Peptona de caseína 2,5 g; Extracto de levadura 3 g; Agar-agar 12 g.

Preparación

Se adiciona 1 % de tributirina. El medio se siembra por el procedimiento de incorporación y vertido o por estría en superficie. Incubación a temperatura óptima durante 72 horas.

**Caldo triptona**Composición (g/litro)

Peptona de caseína 10 g; cloruro sódico.

Preparación

Disolver 15 g/litro, distribuir en tubos y esterilizar en autoclave (15 min. a 121° C). pH: 7,3. El color del caldo es claro e incoloro.

**Caldo cerebro corazón**Composición (g/litro)

Substrato alimenticio (extracto de cerebro, extracto de corazón y peptona) 27,5; D(+) glucosa 2,0; cloruro sódico 5,0; hidrógenofosfato disódico 2,5 .

Preparación

Se disuelven 37 g /litro y se esteriliza en autoclave (15 min. a 121° C). Se regula el pH: 7,4 ± 0,2. El color del caldo es ligeramente parduzco.

**Agar manitol- yema de huevo - polimixina (MYP)**Composición (g/litro)

Peptona 1; manitol 10; cloruro sódico 2; SO<sub>4</sub>Mg 0,1; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,25; azul de bromotimol (o rojo de fenol) 0,12; piruvato de sodio 10; agar agar 14; polimixina B 5000 unidades equivalente a 100.000 Unid./ l de medio. Se regula el pH a 7,2.

Preparación

Se suspenden 20,5 g en 475 ml de agua destilada y se hierve hasta disolver completamente. Se esteriliza en autoclave (15 min. a 121° C). Se calienta a 50 °C y asepticamente se adiciona 1 vial de suplemento (polimixina B) reconstituida con 2 ml de agua destilada y luego 25 ml de emulsión estéril de yema de huevo. Se mezcla bien y se distribuye en placas. La peptona al 0,1 % y la adición de piruvato de sodio mejora la precipitación y aumenta la esporulación.

El azul de bromotimol ( o el rojo de fenol ) es añadido como indicador para detectar la utilización de manitol. El medio tiene una concentración final de 100 Unidades de polimixina B como agente de aislamiento (sugerido por Donovan y aceptado satisfactoriamente por Mossel).

**Caldo nutritivo**Composición (g/litro)

Peptona de carne 5,0; extracto de carne 3,0.

Preparación

Se suspenden hasta disolución 8 g / litro y se esteriliza en autoclave (15 min. a 121° C). pH: 7,0 ± 0,2. El color del caldo es claro e incoloro hasta con una tonalidad amarillenta.

**Medio KF para estreptococos (base)**Composición (g/litro)

Proteosa-peptona 10,0; extracto de levadura 10,0; cloruro sódico 5,0; glicerofosfato sódico 10,0; maltosa 20,0; lactosa 1,0; azida sódica 0,4; Púrpura de bromocresol 0,015; Agar-agar 15,0.

Aditivo: 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC) 0,1.

Preparación

Se disuelven 71,5 g / litro y se esteriliza en autoclave (10 min. a 121 °C). pH: 7,2. Dejar enfriar hasta 50 °C aproximadamente, se incorporan 10 ml de una solución al 1 % de TTC (2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro). Se vierte en placas. Las placas con medio de cultivo son claras y de color violeta. Incubación 48 horas a 37 °C.

**Agar plate count (Agar peptona de caseína-glucosa-extracto de levadura)**Composición (g/litro)

Peptona de caseína 5,0; extracto de levadura 2,5; D(+) glucosa 1,0; Agar-agar 14,0.

Preparación

Se disuelven 22,5 g/litro y se esterilizan en autoclave (15 min. a 121 °C). Se regula el pH: 7,0. Las placas con medio de cultivo son claras e incoloras.

**YGC (Agar-extracto de levadura-glucosa-cloramfenicol)**Composición (g/litro)

Extracto de levadura 5,0 ; D(+) glucosa 20,0; cloramfenicol 0,1; agar-agar 14,9.

Preparación

Se disuelven 40 g/litro y se esteriliza en autoclave (15 min. a 121° C). Se controla el pH: 6,6. Las placas con medio de cultivo son claras y parduzcas. Se incuba unos 4 días a 25 °C.

**Agar EMB (Agar eosina-azul de metileno - lactosa - sacarosa)**Composición (g/litro)

Peptona 10,0; hidrogenofosfato dipotásico 2,0; lactosa 5,0; sacarosa 5,0; eosina amarillenta 0,4; azul de metileno 0,07; agar-agar 13,5.

Preparación

Se disuelven 36 g/litro, se esteriliza en autoclave (15 min. a 121 ° C) y se vierte en placas. Regular el pH: 7,1. Las placas se siembran finamente en superficie, por estría. Incubación: 24 horas a 37 °C.

**Caldo Mc Conkey**Composición (g/litro)

Peptona de caseína 20,0; lactosa 10,0; bilis de buey, desecada 5,0; púrpura de bromocresol 0,01.

Preparación

Se disuelven 35 g/litro, se fracciona en tubos provistos de campanas DURHAM y se esteriliza en autoclave (15 min. a 121° C). pH: 7,1. El caldo distribuido es claro y color violeta. Incubación: 48 horas a 37 °C.

Formación de gas y ácido: Sospecha de presencia de *E. coli* eventualmente junto con Coliformes.

Sólo formación de ácido: Sospecha de presencia de Coliformes, sin existencia de *E. coli*.

**Agar VCRB (Agar- violeta cristal- rojo neutro- bilis )**Composición (g/litro)

Peptona de carne 7,0; extracto de levadura 3,0; cloruro sódico 5,0; lactosa 10,0; Rojo neutro 0,03; mezcla de sales biliares 1,5; violeta cristal 0,002; agar-agar 13,0

Preparación

Se disuelven 39,5 g/litro, y se esteriliza con cuidado a vapor fluente (30 min.). pH: 7,4. El medio de cultivo preparado es claro y rojizo parduzco. Incubación: 24 horas a 37 °C.



**Medio de cultivo OF (Medio de cultivo para el ensayo de oxidación-fermentación) seg. Hugh y Leifson (base)**

Composición (g/litro)

Peptona de caseína 2,0; extracto de levadura 1,0; cloruro sódico 5,0; lactosa 10,0; hidrogenofosfato dipotásico 0,2; Azul de bromotimol 0,08; agar-agar 2,5.  
Aditivo: carbohidrato 10,0

Preparación

Se suspenden y disuelven 11,0 g/litro, y se esteriliza en autoclave (15 min. a 121° C). Se deja enfriar hasta 50 °C y se incorporan 100 ml/litro de una solución, esterilizada por filtración, al 10 % de D (+) glucosa, lactosa, sacarosa u otro carbohidrato. Se distribuye en tubos hasta alcanzar unos 5 cm de altura. En la mitad de los tubos preparados, e inmediatamente después del enfriamiento, se recubre el medio de cultivo con una capa de parafina líquida estéril. pH: 7,1. El medio de cultivo preparado es claro y de color verde. Incubación: 48 horas a temperatura óptima.

**Caldo Brila (Caldo verde brillante- bilis- lactosa)**

Composición (g/litro)

Peptona 10,0; lactosa 10,0; bilis de buey, desecada 20,0; verde brillante 0,0133.

Preparación

Se disuelven 40 g/litro, distribuir en tubos de ensayo provistos de campanas de DURHAM y se esterilizan en autoclave (15 min. a 121° C). pH: 7,2 ± 0,2. El caldo de cultivo preparado es claro y de color verdoso. Se siembran los tubos.

Incubación: 24-48 horas a 37 °C ó a 44,5 °C.

## BIBLIOGRAFIA

- ABE, J. ; BERGMAN , F. W. ; OBATA , K, y HISUKURI , S. 1988.  
Production of the raw-starch digesting amylase of *Aspergillus sp* K-27  
Appl. Microbiol. Biotechnol. 27: 447.
- ABE, J. ; NAKAJIMA, K. ; NAGANO, H. y HIZUKURI, S. 1988.  
Properties of the raw-starch digesting amylase of *Aspergillus sp* K-27  
A synergistic action of glucoamylase and alpha-amylase. Carbohydr.  
Res. 175 : 85.
- ALEXOPOULOS C. J. y MIMS, C. W. 1985. Zigomicotinas. Clase zigo-  
micetes y ascomicotinas. Clase ascomicetes. Subclase plectomicétidas.  
En : Introducción a la micología : 195- 313. Ed. Omega S. A.
- ANSON, M.L.1939. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathep-  
sin with hemoglobin. J. Gen. Physiol. 22 : 79-89
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. Association of official ana-  
lytical chemists. Food composition 15<sup>th</sup> Edition : 777- 800
- APHA. 1976. Compendium of methods for the microbiological examina-  
tion of foods : 79-85. M. L. Speck, ed. Inc. Washington.
- APHA -AWWA-WPCF . 1992 . Métodos normalizados para análisis de  
aguas potables y residuales : 100-124. Ed. Diaz de Santos S.A.
- AUTRAN, J.C. 1994. Size-exclusion high-performance liquid chroma-  
tography for rapid examination of size differences of cereal proteins.  
En: HPLC of cereal proteins and legumes : 326-372. J. E. Kruger and J.A.  
Bietz, eds. A.A.C.C., St Paul, MN. USA.
- AZAR, M ; TER-SARKISSIAN, N. ; GHAVIFECK, H. ; FERGUSON, I.  
y G'HARSEMI, H. 1977. Microbiological aspects of Sangak bread. J.  
Food Sci Technol. 14/6 : 251-254.
- BAIRD-PARKER, A. C. 1966. Methods for classifying staphylococci and  
micrococci. En : Identification methods for microbiologists. Part A: 59-  
63. Ed. B.M. Gibbs y F. A. Skinner. Academic Press. London-New York.
- BANASIK, O. J. ; DONNELLY, B. J. y SIBBITT, L.D. 1978. Die qualitat der  
1977 in nord-Dakota geernteten hard-red-spring -und durum-weizen.  
Muehle Mischfutttech. 115 (20) : 297-300.
- BARBER, S y BAGUENA, R. 1988. Microflora de la masa panaria : V.  
Aislamiento, identificación y evaluación de las propiedades funcionales  
de los microorganismos de la masa madre. Rev. Agroquím. Tecnol. Ali-  
ment. 28 (1) : 67-76.
- BARBER, S ; BAGUENA, R.; MARTINEZ ANAYA, M.A. y TORNER, M.  
J. 1983. Microflora de la masa panaria. Identificación y propiedades fun-  
cionales de los microorganismos de masas madre industriales, elabora-  
das con harina de trigo. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 23 (4): 552-562.
- BARBER , S., MARTINEZ ANAYA, M. A. y BAGUENA, R. 1985 a. Micro-  
flora de la masa madre panaria. II. Propiedades funcionales en disolucio-  
nes de azúcares, de cepas puras de *S.cerevisiae* y de levaduras comerciales  
de las que proceden. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 25 (3) : 436-446.
- BARBER , S., MARTINEZ ANAYA, M. A. y BAGUENA, R. 1985 b. Micro-  
flora de la masa madre panaria. III. Propiedades funcionales en masas  
elaboradas con harina de trigo de cepas puras de *S.cerevisiae* y de levadu-  
ras comerciales de las que proceden. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.

- 25 (3) : 447-457.
- BARBER, S. ; MARTINEZ ANAYA, M. A. ; BAGUENA, R. y TORNER, M. J. 1987a. Microflora de la masa madre panaria. IV. Propiedades funcionales en masas elaboradas con harina de trigo de microorganismos puros - levaduras y lactobacilos -aislados de masas madre industriales. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 27 (1) : 107-119.
- BARBER, S. ; MARTINEZ J. ; CORNEJO L. y BENEDITO DE BARBER, C. 1991. Effects of different sour dough on the rheological and fermentative characteristics of bread dough *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 31 (4) : 512-522 .
- BARBER, S. ; MARTINEZ ANAYA, M.A.; B. de BARBER, C.; ESPARZA, M.; AGUILAR, F. y CONTRERAS, M. 1987 b. Un modelo de evaluación de la calidad de panes típicos regionales. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, 27 (2) : 291-303.
- BARBER, S. ; TORNER, M. J; MARTINEZ ANAYA, M.A y BENEDITO de BARBER, C. 1989. Microflora of the sour dough of wheat flour bread: IX: Biochemical characteristics and baking performance of wheat doughs elaborated with mixtures of pure microorganisms. *Z. Lebensm. Unters Forsh* 189 : 6-11.
- BECHTEL, D. B. ; POMERANZ, Y. y de FRANCISCO, A. 1978. Breadmaking studied by light and transmission electron microscopy. *Cereal Chem.* 55 : 392-396.
- BENEDITO DE BARBER, C. ; COLLAR, C. y BARBER, S. 1986. Cambios de los constituyentes químicos durante la fermentación panaria.VI. Gliadinas extraídas con distintos disolventes del gluten de trigo. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 26 (3) : 373-379.
- BENEDITO DE BARBER, C. ; COLLAR, C. ; PRIETO, J.A. y BARBER, S. 1985 Cambios de los constituyentes químicos durante la fermentación panaria. II. Fracción nitrogenada soluble en agua de la masa. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 25 (3) : 428-435 .
- BERGEY'S manual of determinative bacteriology 1986 Ed. SNEATH, P.H.A MAIR, N.S. ; SHARPE, M.E. y HOL, J. G. Vol. II. : 1003- 1234. Ed. Williams y Wilkins. Baltimore. USA.
- BERGMAN, F.W ; ABE, J. y HISUKURI , S. 1988. Selection of organisms which produce raw-starch degrading enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 27 : 443.
- BLANCHI , E. M. 1993. Determinación de diastasa en miel : 6-15. Ed. por el CEDIA. Ed. El Liberal. Santiago del Estero. Rep. Argentina.
- BIETZ, J. A. y SIMPSON, D. G. 1992. Electrophoresis and chromatography of wheat proteins : available methods and procedures for statistical evaluation of the data. *J. of Chromatogr.* 624 : 53-80.
- BORAAM, F ; FAID, M ; LARPENT J. P. y BRETON, A. 1993 Lactic acid bacteria and yeast associated with traditional Moroccan sour-dough bread fermentation. *Sci. Aliments* 13 : 501-509.

- BOURGEOIS, C. M. y LARPENT J. P. 1995. La fermentación del pan y de los productos de bollería. En : Microbiología alimentaria : Fermentaciones alimentarias. Vol. 2 : 57- 71. Ed. Acribia S. A. Zaragoza. España.
- BOURGEOIS, C. M. ; MESCLE, J. F. y ZUCCA J. 1994 . El comportamiento de los microorganismos en los alimentos : 21-26 y Las levaduras y los mohos : 167- 192 . En : Microbiología alimentaria : Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria" Vol. 1. Ed. Acribia S.A. Zaragoza. España.
- BRÜMMER, J. M. y FISHER, J. 1990. Systematic studies on wheat sour. *Industries des Céréales* 66: 27-30
- BUCK, J. S. WALKER, C.E. y WATSON K.S. 1987. Incorporation of corn-gluten meal and soy into various cereal-based foods and resulting product functional, sensory and protein quality. *Cereal Chem.* 64 (4): 264-269.
- BUSHUK, W. 1975. Development, licensing and distribution of new varieties of grains in Canada. En : Grains and oilseeds. handling, marketing, processing : 287-309. 2nd ed. Canada International Grains Institute. Winnipeg.
- BUTTERFIELD, C.T. 1932. The selection of dilution water for bacteriological examinations. *J. Bacteriol.* 23 : 355.
- CELSI, S. A. y COPELLO, M. A. 1960. Análisis cuprivolumétricos. En : Iniciación experimental a la química analítica cuantitativa : 259- 263. Ed. El Ateneo. Buenos Aires. Argentina.
- COLLAR, C. ; MASCAROS, A. F. ; FRECHILLA, S. y BENEDITO de BARBER, C. 1991. Capacidad proteolítica de bacterias acidolácticas iniciadoras de la fermentación de masas panarias de harinas de trigo. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 31 (3) : 343-351.
- COLLAR ESTEVE, C. ; BENEDITO DE BARBER, C. y MARTINEZ ANAYA, M.A. 1994 a. Microbial sour doughs influence acidification properties and breadmaking potencial of wheat dough. *J. Food Sci.* 59, N°3 : 629-633.
- COLLAR ESTEVE, C ; MARTINEZ ANAYA, M.A. y BENEDITO de BARBER, C. 1994 b. Interactive effects between microbial breadmaking starters and wheat flours on sour dough and bread quality. *Rev. Española de Ciencia y Tecnol. de Aliment.* 34 (2) : 191-201.
- COTTENET, M. 1980 Les Glucides. Bases bioquímiques de la qualité biscuitière des farines de blé . *Sci. Aliments* 6 N° 3 : 317-324.
- CHAMBERLAIN, N. ; COLLINS, T. H. y Mc DERMOTT, E. E. 1983. The influence of  $\alpha$ -amylase on loaf properties in the UK. En : Progress in cereal chemistry and technology : 841-845. Ed. Holas, J. y Kratochvil, J. Elsevier. Amsterdam.
- D'APOLONIA, B. L. y KIM, S. K 1976. Recent developments on wheat flour pentosans. *Bakers Dig.* 50 (3) : 45-49.
- DEAK, T. y TIMAR, E. 1988. Simplified identification of aerobic sporeformers in the investigation of foods. *Int. J. Foods Microbiol.* 6 : 115-125.

- DEFLOOR, I. ; NYS, M. y DELCOUR, J. A. 1993. Wheat starch, cassava starch, and cassava flour impairment of the breadmaking potential of wheat flour. *Cereal Chem.* 70 (5) : 526-530.
- de MAN, J. C. ROGOSA, M. y SHARPE, M.E . 1960 . A medium for cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bact.* 23 : 130-135
- DETTORI-CAMPUS, B.G. ; PRIEST, F.G. y STARK, J. R. 1992. Hydrolysis of starch granules by the amylase from *Bacillus stearothermophilus* NCA 26 . *Process Biochem.* 27 : 17-21.
- EL-TAMINI, A. 1975. Studies of egyptian bread. I : Microbiology of flour and sourdough. II: Microbiology of dough before and after the fermentation. *Alimenta* 14 ( 4) : 123-126.
- FAID, M ; BORAAM, F. ; ACHBAB, A. y LARPENT J. P. 1993. Yeast- lactic acid bacteria interactions in Moroccan sour-dough bread fermentation. *Lebensm.- Wiss. u.- Technol.* 26 : 443-446.
- FAID, M ; BORAAM, F.; ZYANI, I. y LARPENT J. P. 1994. Characterization of sourdough bread ferments made in the laboratory by traditional methods. *Z. Lebensm. Unters Forsch* 198 : 287-291.
- FENNEMA, O.R. 1985 a. Aminoacids, peptides and proteins. En: *Food Chemistry* : 246-369. Ed. Marcel Dekker Inc. New York.
- FENNEMA, O.R. 1985 b. Aminoácidos, péptidos y proteínas. En : *Introducción a la ciencia de los alimentos*. Tomos 1: 239-326. Ed. Reverté S.A. Barcelona. España.
- FIELDS, M. 1978. Métodos generales de laboratorio y taxonomía . En : *Métodos para el estudio de bacterias esporuladas térmofilas de interés en las industrias alimentarias y sanitarias* : 27-165. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- FINNEY, K. F. 1984. An optimized, straight-dough, bread-making method after 44 years. *Cereal Chem.* 61 (1) : 20-27.
- FINNEY, K. F. y BARMORE, M. A. 1939. Maintaining a uniform temperature in an experimental baking oven. *Cereal Chem.* 16- 289-292.
- FINNEY, K. F. y BARMORE, M. A. 1943. Yeast variability in wheat variety test baking. *Cereal Chem.* 20 : 194-200.
- FINNEY, K. F. y BARMORE, M. A. 1944. Flour blends and the question of complementary effects. *Cereal Chem.* 21: 65-68.
- FINNEY, K. F. y BARMORE, M. A. 1945. Varietal responses to certain baking ingredients essential in evaluating the protein quality of hard winter wheats. *Cereal Chem.* 22 : 225- 230.
- FUSELLI, S. R. ; CASALES , M. R ; FRITZ, R. y YEANNES, M. I. 1994. Microbiological study of marination process of anchovy *E. anchoita*. *Lebensm.- Wiss. u.-Technol.* 27 : 213-218.
- GALLI, A. y OTTOGALLI, G. 1973. Microflora of sour-dough of panettone cake. *Ann. Microbiol. Enzymol.* 23 (1,2,3) : 39-40.
- GAN, Z. ; ELLIS P. R. ; VAUGHAN J. G y GALLIARD,T. 1989. Some effects of non-endosperm components of wheat and added gluten on whole-meal bread microestructure. *J. Cereal Sci.* 10 : 81-91.
- GIBBS, B.M. y SKINNER, F.A. 1966. Methods for classifying Staphylococci and Micrococci : 59-63 e Identitification of the lactic acid bacteria: 72-76.

- En : Identification methods for microbiologists. Academic Press Inc. London.
- GILBERT, R. J. 1983. Food borne infections and intoxications recent. Trends and prospects for the future. En : Food microbiology: 47-66, editado por T.A. Roberts and F.A. Skinner. Ed. Academic Press. UK.
- HALFORD, N. G. ; TATHAM, A. S. ; SUI, E ; DARODA, L.; DREYER, T. y SHEWRY, P. R. 1992. Identification of a novel  $\beta$ -turn-rich repeat motif in the D-hordeins of barley. Bioch. and Biophys. Acta 1122 : 118-122.
- HANSEN, A. y HANSEN, B. 1994. Influence of wheat flour type on the production of flavour compounds in wheat sourdoughs. J. Cereal Sci. 19 : 185-190.
- HARDY, J. L. 1982 Thèse de 3ème cycle UTC. Citado por Bourgeois, C. M. y Larpent, J. P. 1995 en: Microbiología alimentaria. Vol. 2. Fermentaciones alimentarias : 71. Ed. Acribia S. A. Zaragoza. España.
- HARINDER K. y BAINS G.S. 1987. High alpha- amylase flours : Effect of pH, acid, and salt on paste characteristics. Cereal Chem. 64 (6) : 359-363.
- HASSID, W. Z. y ABRAHAM S. 1966. Chemical procedures for analysis of polysaccharides . En : Methods in enzymology . Vol III : 34-50 . Ed. Academic Press.
- HE, H. y HOSENEY R. C. 1991. Differences in gas retention, protein solubility and rheological properties between flours of different baking quality. Cereal Chem. 68 (5) : 526-530.
- HENRY, R.J. y SAISI, H. S. 1989. Characterization of cereal sugars and oligosaccharides. Cereal Chem. 66 (5) : 362- 365.
- HOUNHOUGAN, O. J. ; NOUT, M. J. R. ; NAGO, C. M. ; HOUBEN, J. M. y ROMBOUTS, F. M. 1993. Composition and microbiological and physical attributes of mawe, a fermented maize dough from Benin. Int. J. Food Sci. Technol. 28 (5) : 513- 517.
- ICMSF. 1983. Métodos recomendados para el análisis microbiológico de los alimentos. En : Microorganismos de los alimentos I. Técnicas de análisis microbiológicos. Vol.1 2da ed. : 105-280. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- ICMSF. 1984. Cereales y productos derivados. En : Ecología microbiana de los alimentos. II. Productos alimenticios : 678-738. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- INAGAKI, T. y SEIB, P. A. 1992. Firming of bread crumb with cross-linked waxy barley starch substituted for wheat starch. Cereal Chem. 69 : 321-325
- JAVANAINEN, P. y LINKO, Y.Y. 1993. Factors affecting rye sour dough fermentation with mixed-culture preferment of lactic and propionic acid bacteria. J. Cereal Sci. 18 : 171- 185.

- JAY, J. M. 1981. Parámetros intrínsecos y extrínsecos relacionados con la microbiología de los alimentos : 28-41 ; Alteraciones del pan y de los productos de pastelería : 153 ; Empleo de radiaciones en la conservación de alimentos : 190-214 ; Conservación de alimentos por altas temperaturas: 229-242. En : Microbiología moderna de los alimentos 2da ed. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España.
- KANDLER, O. y WEISS, N. 1986. Regular, nonsporing Gram positive rods. BERGEY'S manual of systematic bacteriology Vol. 2 : 1208-1235. Ed. Williams and Wilkins. Baltimore. USA.
- KLINE, L. y SUGIHARA, T. 1971. Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process II : Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for souring activity. Appl. Microbiol. Vol 21 N° 3 : 459-465.
- KREGGER-van RIJ, N. J. 1984. Classification of yeasts. En : The yeasts: A taxonomic study : 1-99. 3rd ed. Elsevier Publishing Co. Amsterdam.
- KREIS, M. ; FORDE, B. G. ; RAHMAN, S. ; MIFLIN, B. J. y SHEWRY, P. R. 1985. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. J. Mol. Biol. 183 : 499-502.
- KULP, K. ; CHUNG, H. ; MARTINEZ ANAYA, M.A. y DOERRY, W. 1985. Fermentation of water ferments and bread quality. Cereal Chem. 62 (1) : 55-59.
- KULP, K. y PONTE, J. G. Jr. 1981. Staling of white bread : Fundamental causes. CRC Crit. Rev. Food Sci Nutr. 15: 1-4.
- KURACINA, T.A.; LORENZ, K. y KULP, K. 1987. Starch functionality as affected by amylases from different sources. Cereal Chem. 64 : 182-186.
- LANGEMEIER, J. M. y ROGERS, D.E. 1995. Rapid method for sugar analysis of doughs and baked products. Cereal Chem. Vol. 72 (4) : 349-351.
- LONNER, C. ; WELANDER, T. ; MOLIN, N. ; DOSTALEK, M. y BLISCKSTAD, E. 1986. The microflora in a sour dough started spontaneously on typical Swedish rye meal. Food Microbiol. 3 : 3-12.
- MARTIN, M.L. y HOSENEY, R. C. 1991. A mechanism of bread firming II: Role of starch hydrolyzing enzymes. Cereal Chem. 68 : 503-507.
- MARTIN, M.L., ZELEZNAK, K. J. y HOSENEY, R. C. 1991. A mechanism of bread firming I- Role of starch swelling. Cereal Chem. 68 : 498- 503.
- Mc CLEARY, B.V. y COOD, R. 1989. Measurement of  $\beta$ -amylase in cereal flours and commercial enzyme preparations. J. Cereal Sci. 9 : 17-33.
- Mc FADIN, J. F. 1980. Reacción de Voges Proskauer : 190-197, Prueba del indol: 104-110, Prueba del rojo de metilo : 134-137, Prueba del citrato : 45-49. En : Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana. Bs As.
- MEREDITH, P. y YENKINS, L. D. 1973. Amylases of developing wheat, barley and oat grains. Cereal Chem. 50 : 243 254.
- MILLER, B. S. ; JOHNSON, J. A. y PALMER, D. L. 1953. A comparison of cereal, fungal, and bacterial alpha-amylases as supplements for breadmaking . Food Technol. 7 : 38-41.



- MITSCHELE, O. J. ; LAGOMARSINO, A. y KRIVORUCHCO, D. 1978. Estudio de la microflora del trigo y sus harinas en el proceso de obtención de las mismas. La alimentación Latinoamericana : 36-41.
- MOHAMMED, S.I.; STEENSON, L.R. y KIRLEIS, A.W. 1991. Isolation and characterization of microorganisms associated with the traditional sorghum fermentation for production of sudanese kisra. Appl. Environ. Microbiol. Vol 47 ( 9 ) : 2529- 2533.
- MOOT, D. J. y EVERY, D. 1990. A comparison of bread baking, falling number,  $\alpha$ -amylase assay and visual method for the assessment of pre-harvest sprouting in wheat. J. Cereal Sci. 11 : 225-234.
- MOSSEL, D.A. y MORENO GARCIA, B. 1985. Alteraciones de los alimentos por microorganismos : 54-89 y Técnicas para el análisis microbiológico de los alimentos : 214-272. En: Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia S.A. Zaragoza. España.
- NIVEN, C. F. Jr, SMILEY, K.L. y SHERMAN, J.M. 1942. The hydrolysis of arginina by *Streptococci*. J. Bacteriol. 43 : 651-660.
- OCAFOR, N. 1977. Microorganisms associated with cassava fermentation for garri production. J. Appl. Bacteriol. 42 : 279- 284.
- ORLA -JENSEN, S. 1919. The lactic acid bacteria. Mem. Acad. Roy. Sci. Letters. Danemark, Sec. Sci. Ser. 8 (5) : 81.
- OSBORNE, T. B. 1907. The proteins of the wheat kernel. Pub. 84. Carnegie Inst. of Washington : 119-122. Washington, DC.
- OSBORNE, D. R. y VOOGT, P. 1982. Proteínas y compuestos nitrogenados En : Análisis de los nutrientes de los alimentos : 118-121. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España.
- PALACIOS, D. L. y TRUCCO, R.E. 1994. Estudio de la flora bacteriana durante la maduración de anchoíta salada *Engraulis anchoita* . Tesis de grado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UNMdP. Mar del Plata.
- PEDERSON, C. S. 1971. Some Cereal Foods. En : Microbiology of food fermentations : 173-198. Ed The Avi Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut.
- PEZOLET, M. ; BONENFANT, S. ; DOUSSEAU, F. y POPINEAU, Y. 1992. Conformation of wheat gluten proteins : Comparison between functional and solution states as determined by infrared spectroscopy. FEBS - Fed. European Biochem. Soc. , 299 (3) : 247-250 .
- POMERANZ, Y. 1978 . Rheology and chemistry of dough. En : Wheat: chemistry and technology. Vol. III : 524- 567. 2nd edition American Association of Cereal Chemists, Inc. St Paul, Minnesota, USA.
- POMERANZ, Y. 1985 a. Some Traditional Foods. Wheat Flour Components in Bread Making. En : Functional properties of foods components 396-426. Ed. American Association of Cereal Chemists, Inc. St Paul, Minnesota, USA.
- POMERANZ, Y. 1985 b. Sprouted grain. En : Advances in cereal science and technology. Vol VII : 239-320. Ed. American Association of Cereal Chemists, Inc. St Paul, Minnesota, USA.

- POMERANZ, Y; MEYER, D. y SEIBEL, W. 1984. Wheat, wheat-rye, and rye dough and bread studied by scanning electron microscopy. *Cereal Chem.* 61 (1) : 53-59.
- PRIETO, J. A ; COLLAR, C. y BENEDITO de BARBER, C. 1990. Reversed-phase high-performance liquid chromatography determination of biochemical changes in free amino acids during wheat flour mixing and bread making. *J. Chromatogr. Sci.* 28 (11) : 572- 577.
- PRIMO YUFERA, E. 1979. Cereales y harinas. En : *Química agrícola III - Alimentos* : 27-127. Ed. Alhambra. España.
- REGENSTEIN, J. M. y REGENSTEIN, C.E. 1984. Food protein chemistry. En : *Food science and technology. A series of monographs* : 274- 291. Ed. Academic Press.,Inc. London- New York.
- REED, G. y THORN J. A. 1978. Enzymes . En : *Wheat chemistry and technology Vol III (Y. Pomeranz)* : 453- 473. 2nd edition American Association of Cereal Chemists, Inc. St Paul, Minnesota, USA.
- ROUAV, X. 1993. Investigations into the effects of an enzyme preparation for baking on wheat flour pentosans. *J. Cereal Sci.* 18 (2) : 145-157.
- SAG. Método de panificación experimental de la Secretaría de Agricultura y Ganadería .1952. Decreto Nro 13005 del Poder Ejecutivo Nacional.
- SAIZ, A.I. ; PEREZ BORLA, O. y FRITZ, R. 1996. El gluten como mejorado de harinas de trigo. Aceptado para su publicación (Octubre de 1996) en *Alimentaria*. España.
- SARATH, G.; MOTTE, R.S. de la y WAGNER, F. W. 1989. Protease assay methods. En : *Proteolytic enzymes. A practical approach* : 25-26. Ed. por BEYNON R. J. y BOND J. S. Oxford.
- SCHLEIFER, K. H. 1986 . Family I -Micrococcaceae. En : *BERGEY'S manual of systematic bacteriology Vol II* : 1003-1008. Ed. Williams and Wilkins. Baltimore. USA.
- SHEWRY, P.R. y TATHAM, A. S. 1990. The prolamin storage proteins of cereal seeds : structure and evolution. *Biochem. J.* 267 : 1-12.
- SHOGREN, M.D. y FINNEY, K.F. 1984. Bread-making test for 10 grams of flour. *Cereal Chem.* 61 (5) : 418-423.
- SIEVERT, D. y POMERANZ, Y. 1990. Differential scanning calorimetry studies on heat-treated starches and enzymes -resistant residues. *Cereal Chem.* 67 (3) : 217-221.
- SNEATH, P.H.A. 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. En : *BERGEY'S manual of systematic bacteriology Vol. II* : 1104-1137. Ed. Williams and Wilkins. Baltimore. USA.
- SAUNDERS, R. M.; NG. H y KLINE , K. 1972. The sugars of flour and their involvement in the San Francisco sour dough french bread process. *Cereal Chem.* 49/1 : 86-91.
- SPICHER, G. ; RABE, E. ; SOMMER, E. y STEPHAN, H. 1981. Die mikroflora des sauerteigs XIV. Mittl. Über das verhalten homofermentative sauerteig- bakterien und hefen bei gemeinsamer kultur. *Z. Lebensm. Unters Forsch* 173 : 291-296.

- SPICHER, G. ; RABE, E. ; SOMMER, E. y STEPHAN, H. 1982. Die Mikroflora des sauersteigs XIV . Mittl. Über das Verhalten heterofermentativer sauersteigbakterien und hefen bei gemeinsamer kultur. Z. Lebensm. Unters Forsch 174 : 222-227
- SPICHER, G. y NIERLE, W. 1984 a. The microflora of sour-dough. XIX: influence of the temperature and dough yield on the proteolytic activity of lactic acid bacteria of sour-dough. Z. Lebensm. Unters Forsch 179 : 36-39.
- SPICHER, G. y NIERLE, W. 1984 b. The microflora of sour-dough. XX: The influence of yeast on the proteolysis during sourdough fermentation. Z. Lebensm. Unters Forsch 179 : 109-112.
- SPICHER G. y NIERLE, W. 1988. Proteolytic activity of sour-dough bacteria Appl. Microbiol. Biotechnol., 28 : 487-492.-
- STAMER, J. R. 1979. The lactic acid bacteria: Microbes of diversity. Food Technol. : 60-65.
- SUGIHARA, T. F.; KLINE, L. y MILLER M.W. 1971. Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process I : Yeasts responsible for the leavening action. Appl. Microbiol. Vol 21 N° 3 : 456-458.
- SUGIHARA, T. F. 1977. Non-traditional fermentations in the production of baked goods. Baker's Dig. 51 : 76-78, 80, 142.
- SURONO. I. S. y HOSONO, A. 1994. Chemical and aerobic bacterial composition of "Terasi" a traditional fermented product from Indonesia. J. Food Hyg. Soc. Japan 35 (3) : 299-304.
- TATHAM, A. S. ; MIFLIN, R.S. y SHEWRY, P. R. 1985. The  $\beta$ -turn conformation in wheat gluten proteins : Relationship to gluten elasticity. Cereal Chem. 62 (5) : 405-412.
- THORNHILL, P.J. y COGAN T.M. 1984. Use of gas-liquid chromatography to determine the end product of growth of lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 47 : 1250-1254.
- TORTOSA, E. ; ORTOLA, C. y BARBER, S. 1985 . Cambios de los constituyentes químicos durante la fermentación panaria. I. Lípidos de la masa panaria. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 25 (3) : 417-427.
- TORTOSA, E. ; ORTOLA, C. y BARBER, S. 1986. Cambios de los constituyentes químicos durante la fermentación panaria. V. Lípidos de la fase líquida. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 26 (2) : 269-275.
- VALJAKKA, T.T. ; PONTE, J. G. y KULP, K. 1994. Studies on a raw starch digesting enzyme. I. Comparison to fungal and bacterial enzymes and an emulsifier in white pan bread. Cereal Chem. 71 (2) : 139-144.
- VAN HOLDE, K. E. 1971. Absorption and emission of radiation . En : Physical biochemistry : 158-179. Ed. Foundations of modern biochemistry series.
- WANISKA, R. D. y GOMEZ, M. H. 1992. Dispersion behavior of starch. Food Technol : 110-123.
- WIESER, H. 1996. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. Acta Paediatr Suppl 412 : 3-9.