



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CICATA-IPN

CENTRO DE INVESTIGACION EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD LEGARIA

POSGRADO EN TECNOLOGIA AVANZADA



Composición del inóculo (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis*
y *Lb. sanfranciscensis*) y su efecto en las
propiedades viscoelásticas de las masas agrias

Tesis
Que para obtener el grado de Maestría en
Tecnología avanzada

P r e s e n t a:

JULIA COLIN OROZCO

Director de tesis

Dra. Ruth Pedroza Islas

Junio 2009



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 14:00 horas del día 24 del mes de junio del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA - Legaria para examinar la tesis de titulada:

Composición del inóculo (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. sanfransincensis*) y su efecto en las propiedades viscoelásticas de las masas agrias

Presentada por el alumno:

Colín
Apellido paterno

Ortízco
Apellido materno

Julia
Nombre(s)

Con registro:

B	0	7	1	7	2	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dra. Ruth Pedroza Islas

Dr. José Guzmán Mendoza

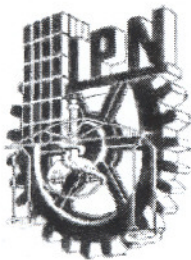
Dr. Fernando Trejo Zarraga

Dr. Eduardo San Martín Martínez

Dr. Rubén Moreno Terrazas

E. PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. José Antonio Irán Díaz Góngora



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **México D. F.** el día 24 de Junio del año **2009** la que suscribe **Julia Colín Orozco** alumna del programa de **Maestría en Tecnología Avanzada** con número de registro **B071729** adscrito a **C.I.C.A.T.A-IPN** manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección de la **Dra. Ruth Pedroza Islas** y cede los derechos del trabajo intitulado "**Composición del inóculo (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. sanfransincensis*) y su efecto en las propiedades viscoelásticas de las masas agrias**" al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN. Legaría 649, Col. Irrigación, 11500 D.F. México. Teléfono 015557296300 ext 67769 Fax e-mail: jcolin_oro@yahoo.com.mx, ruth.pedroza@uia.mx.** Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


JULIA COLÍN OROZCO
Nombre y Firma

Resumen

Las masas de harina de trigo constituyen un sistema complejo donde existe una interrelación entre las proteínas hidratadas y la matriz de almidón produciendo un sistema viscoelástico capaz de retener el gas que se produce durante la elaboración del pan. El uso de masas agrias de trigo fermentadas con bacterias ácido lácticas (BAL) principalmente del género *Lactobacillus* ha tomado gran importancia debido a que existen investigaciones donde reportan que durante la fermentación de la masas agrias las proteínas del gluten sufren una hidrólisis debido a la actividad proteolítica de las BAL, rompiendo los enlaces de los péptidos que provocan la intolerancia al gluten por lo que alteran las propiedades viscoelásticas de la masa, estas propiedades pueden ser explicadas mediante las pruebas reológicas de extensión uniaxial y biaxial. En este trabajo, el objetivo fue evaluar el efecto de la composición del inóculo sobre las propiedades viscoelásticas de las masas agrias. Se elaboraron masas agrias inoculadas con *Lactobacillus plantarum* CDBB-B1091 *Lactobacillus brevis* CDBB-B-380, y *Lactobacillus sanfranciscensis* fermentadas durante 24 horas a 30°C. Cada seis horas se tomaron muestras para determinar su comportamiento reológico, pH y acidez, así como sus análisis microestructural. Los resultados obtenidos en la prueba uniaxial se observó que a las 24 h, la masa fermentada con *Lb. sanfranciscensis* disminuyó 10.5% su extensibilidad mientras que la masa con menor resistencia a la extensión fue la producida por *Lb. brevis*. Por otro lado, en la prueba biaxial se observó que conforme aumenta el tiempo de fermentación las masas pierden su componente elástico, teniendo a las 24 h masas con un comportamiento más viscoso. Durante la fermentación se observó una disminución gradual de pH, siendo *Lb. plantarum* el que mayor acidez produjo (3.75) y un porcentaje de acidez de 0.765%.

Palabras clave: masa agria, *Lactobacilli*, viscosidad, elasticidad.

Abstract

The sourdough of wheat flour is a complex system where there is an interrelated between the hydrated protein and matrix starch producing an viscoelastic system capable of retaining the gas produced during the breadmaking. The use of sourdough of wheat with lactic acid bacteria (LAB) mainly genero *Lactobacillus* has great importance because there are investigations which reported that during fermentation of sourdough the gluten protein of gluten suffer hydrolysis due to the activity proteolytic of BAL, breaking the links of the peptidos that causing intolerance to gluten and therefore alter the properties viscoelastic of the dough these properties can be explained by uniaxial and biaxial extension test. In this paper, the objective was to evaluate the effect of inoculum composition on the viscoelastic properties of the sourdough. Sourdough were produced with *Lactobacillus plantarum* CDBB-B109, *Lactobacillus brevis* CDBB -B-380 and *Lactobacillus sanfranciscensis* fermented during 24 h at 30 ° C. Every six hours were sampled to determine their rheological behavior, pH and acidity, as well as microstructural analysis. The results obtained in the uniaxial test that was observed at 24 h, the dough fermented with *Lb. sanfranciscensis* its extensibility decreased 10.5% while the mass with lower resistance to extension was produced by *Lb. brevis*. On the other hand, the biaxial test that was observed with increasing fermentation time the dough lose their elastic component, with mass at 24 h with a more viscous. During fermentation was observed a gradual decrease in pH, and *Lb. plantarum* produced the highest acidity (3.75) and a percentage of acidity of 0.765%.

Keywords: sour dough, Lactobacilli, viscosity, elasticity

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ruth Pedroza Islas por todo el apoyo, consejos, disposición, amistad y paciencia brindados durante mis estudios y realización de este trabajo.

A M. Mayra Febregat, Dr. Ruben Moreno y la M. en C. Mayela de la Rosa, de la Universidad Iberoamericana por el apoyo brindado para la realización de este trabajo así como su amistad otorgada.

A la M. Mónica Centeno y el M. Abel Tinoco Dávila por toda la orientación, paciencia, esmero, disposición y valiosos comentarios que tuvieron para la realización de este proyecto.

A Licha y Cuco por su amabilidad, amistad y ayuda durante la realización de este trabajo

Al personal de del Laboratorio de Pruebas físicas, Miguel Ángel Aguilar, Sr. Miguel e Isabel por su apoyo en todo momento.

Al consejo Nacional de ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico a través del otorgamiento de la beca de maestría.

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	3
INDICE DE CUADROS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
1. ANTECEDENTES	9
1.1 Gluten	9
1.2 Funcionalidad	10
1.3 Tipos de gluten	10
1.4 Reología de la masa	11
1.5 Problemas nutricionales	12
1.6 Tecnología de las masas agrias	13
1.7 Microflora de masas agrias	15
1.8 actividad proteolítica de Bacterias ácido lácticas	16
1.8.1 <i>Lb. sanfranciscensis</i>	18
1.8.2 <i>Lb. brevis</i>	18
1.8.3 <i>Lb. plantarum</i>	19
1.9 Modificaciones del gluten	19
2. OBJETIVO	23
3. HIPOTESIS	23
4. JUSTIFICACION	24
5. MATERIALES Y METODOS	25
5.1. Estimación de la Cinética de crecimiento de los microorganismos	25
5.2. Preparación de inóculo para las masas agrias	25
5.3. Elaboración de masas agrias	25
5.4 determinación de pH y acidez en masas agrias	26
5.5 Prueba de extensibilidad biaxial	26
5.6 prueba de extensibilidad uniaxial	26
5.7 Análisis de microestructura por SEM	26
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7. CONCLUSIONES	51
8. BIBLIOGRAFIA	52

INDICE DE FIGURAS

Figura

1.	Cinetica de crecimiento de UFC/mL <i>Lactobacillus brevis</i> CDBB-B-380, <i>Lactobacillus plantarum</i> CDBB-B1091 y <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	28
2.	Cinética de crecimiento bacteriano absorbancia de <i>Lactobacillus brevis</i> CDBB-B-380, <i>Lactobacillus plantarum</i> CDBB-B1091 y <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	29
3.	Curvas esfuerzo vs tiempo de masas agrias inoculadas con <i>Lb. brevis</i> a diferentes tiempos de fermentación.	34
4.	Curvas esfuerzo vs tiempo de masas agrias inoculadas con <i>Lb. plantarum</i> a diferentes tiempos de fermentación.	35
5.	Curvas esfuerzo vs tiempo de masas agrias inoculadas con <i>Lb. sanfranciscensis</i> a diferentes tiempos de fermentación.	35
6.	Curvas esfuerzo vs tiempo de masas agrias inoculadas con <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> y <i>Lb. sanfranciscensis</i> a diferentes tiempos de fermentación.	36
7.	Curvas esfuerzo vs tiempo de masas agrias acidificada químicamente.	36
8.	Extensibilidad de masas agrias inoculada con <i>Lb. brevis</i> a diferentes tiempos de fermentación.	38
9.	Extensibilidad de masas agrias inoculada con <i>Lb. plantarum</i> a diferentes tiempos de fermentación.	40
10.	Extensibilidad de masas agrias inoculada con <i>Lb. sanfranciscensis</i> a diferentes tiempos de fermentación.	40
11.	Extensibilidad de masas agrias inoculada con la mezcla de los tres microorganismos (<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> y <i>Lb. sanfranciscensis</i>) a diferentes tiempos de fermentación.	41
12.	Extensibilidad de masas agrias acidificadas químicamente a diferentes tiempos de fermentación.	42
13.	Microestructura de masas agrias	44
14.	Micrografías de la modificación estructural de la masa fermentada con <i>Lb. plantarum</i> .	46
15.	Micrografías de la modificación estructural de la masa fermentada con <i>Lb. sanfranciscensis</i> .	47
16.	Micrografías de la modificación estructural de la masa fermentada con <i>Lb. brevis</i>	48

INDICE DE CUADROS

Cuadro		
1	Comparación de pH y acidez durante la fermentación de masas agrias por <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> y una mezcla de ellos.	29
2	Comparación entre el esfuerzo (σ_0) y la relación entre el componente viscoso/elástico (λ_{rel}) de las masas agrias fermentadas con lactobacilos durante diferentes tiempos de fermentación.	37
3	Comparación entre el esfuerzo (σ_0) y la relación entre el componente viscoso/elástico (λ_{rel}) de las masas agrias, (mezcla y control) durante diferentes tiempos de fermentación.	37

INTRODUCCIÓN

El trigo es el cereal más producido en el mundo. El 37% de la población lo utiliza como su principal cereal, aportando alrededor del 20% de las calorías consumidas por el hombre. Su semilla está compuesta de esperma (gérmen) y endospermo, dentro del cual se encuentra uno de los compuestos más importantes del trigo que es la proteína y cuyo contenido varía de 6-25% dependiendo de la variedad, además se encuentran presentes también carbohidratos principalmente almidón (70-75%) y lípidos (aprox. 5%) (Robles, et al. 2005). Las proteínas del endospermo del trigo se pueden clasificar de acuerdo a su solubilidad: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en solución de NaCl) y prolaminas (solubles en etanol 40-70%). Las prolaminas, se encuentran en otros cereales y reciben un nombre diferente dependiendo del cereal del que procedan como: hordeínas (cebada), secalinas (centeno), aveninas (avena) y gliadinas (trigo) (Eliasson, A.C. y Larsson, K. 1993).

El trigo es muy utilizado en la industria de los alimentos ya que es el ingrediente principal en la elaboración de pan, galletas, productos de repostería y pastas. Durante la panificación, al hidratar la harina y someterla a un amasado, se forma una red tridimensional llamado gluten, esta es un complejo visco elástico que se encuentra estabilizada principalmente por puentes bisulfuro, puentes de hidrógeno, fuerzas iónicas y uniones hidrofóbicas, constituido por la fracción de proteínas insolubles en agua llamadas gliadina y glutenina, cuya función principal es la de aglutinar a los gránulos de almidón y, en la panificación retener los gases que se forman durante la fermentación. Además, el gluten controla la calidad del pan de trigo, proporcionando fuerza y elasticidad a la masa y que se encuentra relacionada con las proteínas del gluten ya que la gliadina confiere un flujo viscoso y la glutenina proporciona elasticidad y extensibilidad a la masa (Wieser, 2007).

Por lo tanto, debido a las propiedades que le confiere el gluten a la masa, la harina de trigo es la más utilizada en la industria alimentaria por consiguiente se encuentra presente en gran cantidad de productos alimenticios de consumo habitual. Sin embargo, existen personas que sufren intolerancia al gluten, llamados enfermos celíacos, esta enfermedad es una patología gastrointestinal autoinmune con predisposición genética. En estudios realizados se ha reportado que las proteínas tóxicas para los pacientes celíacos son las prolaminas de trigo (gliadina), esta

proteína del gluten ocasionan atrofia en las vellosidades intestinales provocando una absorción inadecuada de los nutrientes de los alimentos.

El desarrollo de esta enfermedad se desencadena como consecuencia de la presencia de péptidos de la fragmentación de la gliadina, que no son digeridos por proteasas de nuestro propio organismo y son los que resultan tóxicos para el enfermo celiaco. Por lo tanto, durante la fabricación del pan se utilizan microorganismos fermentativos como los lactobacilos que tienen entre otras actividades, actividad proteolítica, la gliadina al ser una proteína se hidroliza por las enzimas proteolíticas de estas bacterias (proteasas). De esta manera las proteasas hidrolizan los enlaces de los péptidos específicos o rompen completamente el péptido a aminoácidos.

La sintomatología de esta enfermedad es amplia y variada: diarrea crónica, pérdida de peso, distensión abdominal, vómitos, dolor abdominal recurrente, cambios de carácter, falta de apetito, anemia y retraso del crecimiento en niños. Sin embargo, este padecimiento puede ser asintomático lo que dificulta su diagnóstico, así que existen personas que la padecen y aun no son diagnosticadas retrasando su tratamiento y provocando el riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes como diabetes, tiroiditis, artritis reumatoide, etc. Esta enfermedad se puede presentar tanto en niños como en adultos y es dos veces más frecuente en el sexo femenino que en el masculino aproximadamente una de cada cien personas la padecen, el tratamiento de esta enfermedad consiste en suprimir el gluten de la dieta de por vida.

En estudios recientes se ha evaluado que mediante la modificación de las gliadinas utilizando bacterias ácido lácticas en la fermentación de masas agrias, los enfermos celiacos podrían consumir productos de trigo. Sin embargo en la actualidad no se cuenta con estudios del efecto de esta modificación en las propiedades viscoelásticas de las masas agrias de trigo y su efecto posterior durante la panificación. Por lo que se ha planteado determinar el efecto en las propiedades viscoelásticas de las masas agrias de acuerdo a la composición del inóculo (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis* y *Lb. sanfranciscensis*).

1. ANTECEDENTES

1.1 Proteínas del trigo y Gluten

El gluten es un complejo de proteínas insolubles en agua que forman una masa gomosa después de retirar el almidón de la harina y los constituyentes solubles en agua, mediante lavado. El gluten está presente en algunos cereales como el trigo, centeno, cebada, avena y triticale jugando un papel importante en la formación de la masa ya que le otorga la capacidad de absorción de agua, cohesividad, viscosidad y elasticidad (Torbica, 2007).

El gluten está compuesto por cientos de proteínas que están presentes como monómeros o conectados por cadenas de bisulfuro, como oligopolímeros. El peso molecular se encuentra en un rango de 30,000 a más de 10 millones de daltons (Der Borght, *et al.*, 2005). El gluten contiene originalmente dos tipos de proteínas: gliadinas y gluteninas que se presentan aproximadamente en proporciones iguales y ambas constituyen del 80% al 85% de las proteínas totales del trigo. Estos tipos de proteína, se distinguen por su solubilidad en agua- alcohol (60% de alcohol): las gliadinas son solubles y las gluteninas insolubles. Ambas fracciones contienen numerosos componentes, caracterizados por su alto contenido en glutamina y prolina (Der Borght, *et al.*, 2005).

Gliadinas

Las gliadinas se encuentran principalmente como polipéptidos monoméricos, es decir proteínas con una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de alrededor de 2,8000-55,000 daltons y pueden ser clasificados, de acuerdo a sus estructuras primarias, en gliadinas α , β , γ , y ω . Las cadenas de bisulfato pueden estar ausentes o presentes como cadenas cruzadas y son parcialmente responsables de las propiedades reológicas de la masa. Las gliadinas son prolaminas que tienen un alto nivel de prolina (15-30%) y glutamina (35-45%) y bajo contenido de lisina (0.2-0.9%) (Wieser, 2007; Dendy y Dobraszczyk, 2001)

Gluteninas

Las gluteninas son polipéptidos poliméricos, es decir tienen varias cadenas unidas mediante enlaces bisulfuro, con un tamaño variado en un rango de 500,000 a más de 10 millones daltons (Wieser, 2007).

1.2 Funcionalidad

La gliadina y la glutenina son fracciones importantes para la contribución de las propiedades reológicas de la masa, pero sus funciones difieren. Las gliadinas hidratadas tienen poca elasticidad y son menos cohesivas que las gluteninas; las gliadinas contribuyen principalmente a la viscosidad y extensibilidad de la masa. Por otro lado, las gluteninas hidratadas son cohesivas, elásticas y son responsables de la fuerza y elasticidad de la masa (Wieser, 2007). Las gliadinas son un plastificante o solvente para las gluteninas. La mezcla de ambas fracciones son esenciales para impartir la propiedad de visco-elasticidad de la masa y la calidad del producto final (Wieser, 2007).

Las gliadinas son viscosas y extensibles de tal forma que las masas hechas solamente con gliadina se comportan como un líquido altamente viscoso pero presentan poca resistencia a la deformación (elasticidad), en cambio las masas elaboradas solamente con gluteninas presentan la falta de extensibilidad de las masas de gliadinas, pero por el contrario, muestran una importante firmeza y elasticidad (Dendy y Dobraszczyk, 2001).

1.3 Tipos de gluten

La harina de trigo puede contener entre el 6% y 20% de proteína, de la cual la mayor parte está formada de gluten. Como ya fue mencionado, tanto la cantidad como la calidad de la proteína del gluten son indicadores de la calidad del trigo, especialmente con relación a la fabricación de pan. Las proteínas del gluten son responsables de la formación de la estructura que retiene el gas de la masa de pan durante la panificación. Por lo tanto la calidad para la panificación viene determinada por diferencias cuantitativas y de composición en las proteínas del gluten y estas proteínas son el principal determinante de las variaciones de la calidad entre diferentes variedades de trigo (Dendy y Dobraszczyk, 2001). Con base a la funcionalidad del gluten, el gluten se puede clasificar en:

a) Gluten fuerte y elástico, apto para la industria mecanizada de panificación debido a su alto contenido de proteínas, es capaz de absorber y retener una gran cantidad de agua, produce masas cohesivas, también son utilizados para mejorar la calidad de trigos débiles

b) Gluten medio-fuerte apto, para la elaboración de pan artesanal o semimecanizado.

c) Gluten débil o suave pero extensible, no produce harinas panificables por si solo, requiere mezclarse con trigos de gluten fuerte o medio fuerte, tienen un bajo porcentaje de proteína, no desarrolla una estructura adecuada y se colapsa. Por estas características es apto para galletas y pasteles.

d) Gluten corto o poco extensible pero tenaz, apto para la industria pastelera y galletera.

e) Gluten corto y tenaz, no es apto para la panificación debido a la baja extensibilidad, la alta tenacidad de la masa que forma lo hace ideal para la elaboración de pastas (Dendy y Dobraszczyk, 2001).

1.4 Reología de la masa

La harina de trigo es única entre las harinas de cereales por su capacidad para retener el gas producido durante el procesado y durante la cocción y por tanto de formar la estructura esponjada típica que se conoce del pan. La capacidad de retención de gas de las masas panarias de harina de trigo se debe a la matriz viscoelástica formada por la hidratación del gluten que tiene la capacidad de comportarse tanto como un fluido viscoso como un sólido elástico dependiendo de las condiciones de temperatura, tiempo y deformación experimentada. En la capacidad de esponjamiento durante la elaboración del pan también influyen otros constituyentes como el almidón y los lípidos (Dendy y Dobraszczyk, 2001).

El trigo contiene 2% de lípidos, los mayores constituyentes son lisofosfolípidos, en particular lisolecitina. La interacción entre lípidos y gluten ocurre durante la aglomeración y mezcla de la masa, formando agregados de alto peso molecular. Las gliadinas se asocian con galactolípidos que son incorporados dentro de los aglomerados de las proteínas del gluten (Der Borght, *et al.*, 2005).

Por otro lado, el almidón es el componente mayoritario del trigo (63%-72%) y está presente en el endospermo del trigo, consiste en polímeros de glucosa, amilosa y

amilopectina. La interacción almidón-gluten juega un papel importante en la determinación de las características reológicas de las masas, sin embargo no son claros los mecanismos que intervienen en dichas interacciones (Der Borgh, *et al.*, 2005).

1.5 Problemas nutricionales

La harina de trigo por su alto contenido en gliadinas es la más utilizada en la industria alimentaria y por lo tanto se encuentra presente en gran cantidad de productos alimenticios de consumo habitual. Debido a que la harina de trigo ha adquirido gran importancia en la alimentación, se han realizado estudios en grupos poblacionales que han manifestado intolerancia al gluten (Enfermos Celiacos).

La enfermedad celiaca (EC) es una enfermedad crónica intestinal causada por la intolerancia al gluten, provocada por el almacenamiento de las proteínas del gluten en el intestino delgado, éstas proteínas no son completamente degradadas por las enzimas gastrointestinales produciéndose péptidos; la mayoría de éstos péptidos tóxicos son derivados de la glutamina y secciones ricas en prolina de las proteínas del gluten. La EC provoca la atrofia de las vellosidades intestinales, lo que conlleva a la mala absorción de los nutrientes que componen la alimentación diaria como proteínas, grasas, carbohidratos, minerales y vitaminas (Di Cagno, *et al.*, 2004; Holtmeier y Caspary, 2006).

A esta EC se le relaciona a las prolaminas, siendo las gliadinas de trigo las que representan mayor toxicidad para estos enfermos, mientras que las menos tóxicas son las provenientes de la avena (Di Cagno, *et al.*, 2004).

Actualmente la incidencia de EC se estima en 1 de cada 150 personas que nacen, y se ha visto que la población celiaca tiende a un crecimiento importante. Se cree que tan sólo el 10% está diagnosticado, con un volumen aproximado de 66,000 celíacos en México (Manifiesto Celiaco, 2007). En la población de Europa y Estados Unidos ocurre en 1 de cada 130 a 300 personas. En el sur de América, Norte América y Asia, la enfermedad celiaca es generalmente menos diagnosticada (Di Cagno, *et al.*, 2005).

La EC no distingue sexo, edad, ni condición social. Existen grupos de población en los que se manifiesta con mayor frecuencia. En estos se encuentran los niños menores de seis años de edad, personas adultas de entre 30 y 40 años, mujeres, enfermos diabéticos, las personas con síndrome de *down*, epilépticos, gemelos homocigotos, entre otros (Gaceta Parlamentaria, 2005).

La sintomatología de la EC se manifiesta de diversas maneras, la más clásica incluye problemas gastrointestinales recurrentes y suele presentarse en infantes; el celiaco puede ser asintomático, pasar por fases latentes, ser diagnosticado a edad adulta o presentar síntomas como: irritabilidad, inapetencia, debilidad, erupciones en la boca, lesiones en la piel, diarrea, fatiga, anemia por falta de hierro, dermatitis herpetiforme, entre otras. (Holtmeier y Caspary, 2006).

La EC ocurre desde el nacimiento, pues existe predisposición genética y el desarrollo de la enfermedad depende de factores aún no determinados, de tal manera que uno no es celiaco cuando le diagnostican, sino que desde que nace. A la EC le acompañan varias enfermedades debido a la mala absorción, por lo que aumenta el riesgo de contraer otros padecimientos tales como: linfomas, enfermedades auto inmunes, esquizofrenia, esterilidad, hemorragias, abortos, cirrosis, artritis, osteoporosis, cáncer intestinal y en el peor de los casos el deceso del paciente (Holtmeier y Caspary, 2006).

La dieta del celiaco debe llevarse a cabo desde el diagnóstico y para siempre para poder tener una vida sana, plena, socialmente activa, emocional y equilibrada, evitando las complicaciones y enfermedades que se derivan del consumo de gluten. El tratamiento efectivo para la enfermedad celiaca es una estricta dieta libre de gluten. La norma vigente del Codex Alimentarius admite hasta 200 ppm de gluten por alimento (Di Cagno, *et al.*, 2005).

1.6 Tecnología de masas agrias

La fermentación es una técnica que ha sido utilizada por miles de años para la preservación de leche, carne y cereales. El pan es uno de los pocos alimentos que

es consumido por muchas sociedades debido a su sabor, aroma y diversidad además posee características importantes como son la frescura del producto, elasticidad, color, textura de la miga y la corteza. La masa agria es utilizada como un producto intermedio de panadería que tiene como objetivo alcanzar dichos requerimientos (Neysens y De Vuyst, 2005).

La masa agria es un método de fermentación de harina de cereales y agua, basado en un proceso primitivo, donde una masa de harina es inoculada con un iniciador microbial “cultivo madre”, la cual es constantemente renovado de una forma cíclica. En un sistema tradicional de masa agria inicialmente parte de la harina mezclada con levaduras y suficiente agua para que esponje, se deja fermentar por algunas horas, comúnmente es toda la noche, expuesto a la atmósfera. La harina fermentada es luego mezclada con el resto de harina, agua sal y grasa para darle consistencia y luego fermentarla por un periodo corto, antes del horneado (Salim-ur-Rehman et al., 2006).

Las masas agrias son utilizadas en la preparación de una gran variedad de pan, galletas, pasteles, botanas, pizza, etc. (Neysens y De Vuyst, 2005; De Vuyst y Vancanneyt, 2007). La fermentación de la masa agria mejora las propiedades de la masa, mejora el volumen, textura, sabor y valor nutricional del pan, además de que retarda el proceso de endurecimiento del pan y crea protección contra el deterioro bacterial (De Vuyst y Vancanneyt, 2007; Katina, et al. 2005). Además puede modificar la salud (healthiness) de los cereales de diferentes maneras: puede mejorar la textura y palatabilidad del grano integral, productos libres de gluten, estabilizar o incrementar los niveles de varios componentes bioactivos, retarda la biodisponibilidad del almidón (productos de bajo indice glicemico) y mejora la biodisponibilidad mineral (Katina, et al. 2005). Otras de las ventajas del uso de masas agrias son las de promover mediante la disminución del pH durante la fermentación: la retención de gas y la resistencia de la red del gluten, inhibición de amilasas de la harina, unión del agua de gluten y gránulos de almidón, hinchazón de pentosas, solubilización del complejo fitato y prevención de una fermentación deficiente y deterioro de las masas agrias (Di Cagno, et al., 2002).

En Europa existen cientos de diferentes tipos de masas agrias, difiriendo en tipo de harina, ingredientes, tipo de fermentación y tecnología aplicada (De Vuyst y Vancanneyt, 2007). Las masas agrias son clasificadas dentro de diferentes tipos, la cual puede variar en su consistencia que pueden ser una masa firme o ser una suspensión líquida de harina o agua, para ello existen tres tipos principales: El Tipo I es una masa agria la cual es recultivada utilizando una parte de la fermentación previa, esta es la tradicional masa agria. Una masa agria de tipo industrial se utiliza una cepa adaptada a una fermentación inicial, esta masa puede ser líquida y tiene un fácil esponjado es llamada de Tipo II. La masa Tipo III es una masa la cual puede ser secada, este tipo de masa agria es a menudo usado por panaderías industriales ya que la calidad es constante y no hay variaciones en el producto final debido a la frescura de la masa agria (Decock y Capella, 2005).

1.7. Microflora de masas agrias

Generalmente, una masa agria es una mezcla de harina (trigo, avena y arroz, etc.) y agua que es fermentada con levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL) que generalmente pertenecen al género *Lactobacillus* (De Vuyst y Vancanneyt, 2007; Gobetti et al. 2005).

Las masas agrias son un ecosistema complejo biológico debido a su composición microbial y efectos interactivos entre el proceso de elaboración del pan y los ingredientes (Gobetti, et al. 2005). La microflora de la masas agrias tienen principalmente asociaciones estables con lactobacilli y levaduras, ya que tienen importantes interacciones metabólicas que contribuyen a los componentes del sabor (Salim-ur-Rehman et al., 2006).

La ecología microbial de la fermentación en masas agrias varia ya que se han identificado más de 50 especies de BAL y más de 20 especies de levaduras, el cual predominan el género *Saccharomyces* y *Candida*, aunque *Saccharomyces cerevisiae* es considerado el organismo más dominante en el pan. Generalmente se considera que en las masas agrias, la proporción de BAL/ levaduras debe ser 100:1 para tener óptimas actividades (Salim-ur-Rehman et al., 2006)

Como ya se ha mencionado, las masas agrias son una fuente importante de diversas especies de bacteria ácido lácticas (BAL) (De Vuyst y Vancanneyt, 2007). Estas son un conjunto de bacterias gram-positivas, en forma de cocos o bastones, no esporuladas y catalasa negativa. Dentro de las BAL se encuentran los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Savijoki, et al. 2006).

El género *Lactobacillus*, son bacterias de forma bacilar que miden 0.5-1.2 x 1.0-10.0 µm, generalmente se encuentran en cadenas cortas, son anaerobias facultativas o microaerófilas, pueden poseer motilidad ayudados por flagelos peritricos. Los lactobacilos son auxótrofos quimioorganotrofos, degradan la sacarosa produciendo ácido láctico como el mayor producto final; su temperatura óptima de crecimiento está entre 30-40°C, estos crecen mejor en medio ligeramente ácido con un pH inicial de 6.4-4.5; su crecimiento disminuye cuando el pH alcanza 4.0-3.6 dependiendo de la especie y cepa (Estela, et al. 2007; Sneath, et al. 1986).

Además, las BAL se clasifican en heterofermentativas y homofermentativas. Las bacterias heterofermentativas producen además de ácido láctico, etanol, acetato y CO₂ este tipo de bacterias es llamada microflora aromática, mientras que las bacterias homofermentativas sintetizan sólo ácido láctico sin liberar CO₂ (León, et al., 2006; Gobetti et al. 2005).

Diversos estudios han tenido como objetivo caracterizar la población de BAL de masas agrias producidas en diferentes países, por ejemplo en Italia han sido ampliamente estudiadas las masas agrias de trigo, la cual han reportado que *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus fructivorans* y *Lactobacillus rossiae* pertenecen al grupo de los microorganismos heterofermentativos obligatorios, mientras que *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus alimentarius* pertenecen al grupo de heterofermentativos facultativos; y *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subs. *delbrueckii* y *Lactobacillus farciminis* son lactobacilos homofermentativos obligatorios (Corsetti, et al. 2007; Gobetti, et al. 2005).

1.8 Actividad proteolítica de BAL

El proceso de la masa agria es un sistema muy complejo que depende de muchos factores como composición de la microflora, fermentación, actividades enzimáticas y características de la harina entre otras cosas. Estos factores simultáneamente afectan el proceso que envuelve la fermentación de la masa como la formación de acidez, la producción de componentes volátiles y la degradación de componentes de carbono y nitrógeno (Katina, 2005).

La degradación de proteínas es un fenómeno clave que ocurre durante la fermentación de la masa agria la cual afecta la calidad del pan con masa agria. Existen el conocimiento de que ocurre una hidrólisis de la proteínas en masas de trigo y centeno. Esta degradación es de gran importancia para el sabor, volumen y textura del pan.

Generalmente, las enzimas proteolíticas (proteasas) son agrupadas en proteinasas y peptidasas. Las proteinasas catalizan la degradación de la proteína en fracciones de pépticos pequeños; las peptidasas hidrolizan enlaces peptídico específicos o rompen completamente péptidos a aminoácidos. La actividad proteolítica de harina de trigo y centeno es atribuido principalmente a proteinasas asparticas y carboxipeptidasas y ambos grupos de proteasas son activadas bajo condiciones ácidas. Las proteínas asparticas de trigo son en parte asociados con gluten (Ganzle, et al. 2008).

Estudios realizados sobre la proteolisis en masas agrias se enfocan en la liberación de aminoácidos. Durante la fermentación de masas agrias, en la mayoría se observa el incremento del nivel de aminoácidos. La comparación de masas agrias y masas químicamente acidificada fermentadas a bajo pH indican que la proteolisis primaria (proteínas a péptidos) en masas agrias de trigo y centeno es principalmente atribuido a proteasa de cereal endógenas. (Ganzle, et al. 2008).

La composición de la microbiota de la fermentación influencia fuertemente la composición y la concentración de aminoácidos en masa. Las levaduras consumen aminoácidos durante su crecimiento y el nivel de aminoácidos incrementan solo después su crecimiento cesa. En contraste, en la fermentación con especies

definidas de bacterias ácido lácticas, los niveles de aminoácidos totales permanecen igual o son mas altos cuando se comparan con un amasa acidificada químicamente. (Ganzle, et al. 2008)

1.8.1 *Lb. sanfranciscensis*

Es una bacteria de forma bacilar, heterofermentativo obligatorio, mide 0.6-0.8 x 2-4 μm , se encuentra solo y en pares, no crece a 45°C pero si a 15°C. *L. sanfranciscensis* fermenta la galactosa, glucosa, gluconato y maltosa (Sneath, et al. 1986). Esta bacteria es una especie autóctona aislado exclusivamente de las masas agrias, generalmente es considerado la bacteria ácido láctica más importante en la fermentación de masas agrias de trigo y centeno, predomina por encima de otros lactobacilos heterofermentativos y también homofermentativos usados en la manufactura de masas agrias italianas (De Angelis et al., 2007).

El azúcar que prevalence en la masas agrias es la maltose, la cual es formada durante la degradación del almidón por α -amilasa. El metabolismo de la maltosa en células de *L. sanfranciscensis* es iniciado por el rompimiento de maltosa a glucosa y glucosa-1-fosfato via maltosa fosforilasa. La glucosa-1-fosfato y parte de la glucosa libre son metabolizadas, además aproximadamente la mitad de la glucosa generada es liberada al medio externo por lo que *L. sanfranciscensis* puede metabolizar la glucosa (Neubauer, et al., 1994)

Usualmente *L. sanfranciscensis* establece asociaciones mutualistas con maltosa negativa en masas agria y contribuye a la reología y propiedades del sabor del pan ya que durante el proceso de acidificación hay liberación de componentes volátiles. El sistema proteolítico de aminoácidos específicos, β -glucosidasa, actividades de manitol deshidrogenasa y la síntesis de exopolisacaridos han sido estudiados en *L. sanfranciscensis* (De Angelis et al., 2007).

1.8.2 *Lactobacillus brevis*

Es una bacteria ácido láctica microerofila, heterofermentativa obligada (utiliza la ruta de fosfocatalasa para producir una mezcla de ácido láctico, etanol, ácido acético y CO_2 como productos de la fermentación de hexosa). Sus células son bacilos redondos, cortos y delgados generalmente miden 0.7-1.0 x 2.0-4.0 μm se encuentran solos o en cadenas cortas. *L. brevis* fermenta la arabinosa, fructosa,

glucosa, gluconato, maltosa, meliobiosa y ribosa, sin embargo no fermenta la esculina, galactosa, lactosa, rafinosa, sucrosa y xilosa. *L. brevis* es considerado débilmente proteolítico. La temperatura óptima de crecimiento de *L. brevis* es de 30°C (Texeira, citado por Robinson, et al. 2000). *L. brevis* es normalmente aislado de leche, queso, productos de cereal, ensilaje, carnes fermentadas, masas agrias, estiércol de vaca y tracto gastrointestinal de humano y ratas (Texeira, citado por Robinson, et al. 2000; Rönka, et al., 2003). Además ha sido reportado que *L. brevis* tiene potencial probiótico (Rönka, et al., 2003).

1.8.3 *Lactobacillus plantarum*

Es un bacilo, delgado mide 0.9-1.2 x 3-8, se encuentra solo, en pares o en cadenas cortas. No crece a 45°C. Los carbohidratos que fermenta *L. plantarum* son: Amigdalina, celobiosa, esculina, fructosa, galactosa, glucosa, gluconato lactosa, maltosa, manitol manosa, melodiosa, rafinosa, ribosa, salicina, sorbitol sucrosa y trealosa. *L. plantarum* es aislado de productos lácteos, masa agria, boca y tracto gastrointestinal de humano (Sneath, et al. 1986).

L. plantarum es una especie importante en la fermentación de varios productos, además se sabe que produce suubstancias antimicrobiales como plantaricin que son activos contra ciertos patógenos, *L. plantarum* también es considerado como probiótico (Cebeci y Gürakan, 2003)

1.9 Modificaciones de gluten

Durante los últimos años se han realizado investigaciones con el objetivo de disminuir la contaminación de los productos libres de gluten de trigo y en general, para disminuir el potencial de toxicidad de productos de cereal teniendo un interés medico, nutricional y económico (Di Cagno, et al. 2005).

Las prolaminas del trigo, centeno y avena contienen estructuras que son dañinas para la gente que es sensible al gluten, la degradación de estas prolaminas durante el procesamiento del alimento puede eliminar este problema. Algunos estudios demuestran que el uso de probióticos, definidos como microorganismos viables que tienen efectos benéficos sobre la salud del hospedante, mejoran el balance intestinal; la mayoría son especies de bacterias ácidos lácticas (BAL) utilizadas para

el procesamiento de alimentos como es en masas agrias para la elaboración de pan (De Angelis, *et al.*, 2005).

La masa agria es una mezcla de harina (trigo, avena y arroz, etc.) y agua que es fermentada con levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL) que generalmente pertenecen al género *Lactobacillus* (De Vuyst y Vancanneyt, 2007;). El uso de masas agrias ofrece grandes ventajas en la tecnología de buenos horneados. La gran parte de estas ventajas son las de promover mediante la disminución del pH durante la fermentación: la retención de gas y la resistencia de la red del gluten, inhibición de amilasas de la harina, unión del agua de gluten y gránulos de almidón, hinchazón de pentosas, solubilización del complejo fitato y prevención de una fermentación deficiente y deterioro de las masas agrias (Di Cagno, *et al.*, 2002). Las masas agrias son usadas para la producción de pan de masa agria, pan clásico, botanas, pizza y productos dulces horneados (De Vuyst y Vancanneyt, 2007).

Di Cagno *et al.*, (2002) realizaron estudios preliminares para describir la actividad proteolítica de 55 cepas de *Lactobacillus*, eligieron a *Lactobacillus alimentarius* 15M, *Lactobacillus brevis* 14G, *Lactobacillus sanfranciscensis* 7A y *Lactobacillus hilgardii* 51B por su capacidad de hidrólisis, éstos fueron utilizados en la fermentación de masas agrias. Posteriormente realizaron un análisis de electroforesis 2DE y se observó que de 37 a 42 polipéptidos fueron hidrolizados por *L. alimentarius* 15M, *L. brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A; la albúmina, globulina y principalmente fracciones de gliadina fueron hidrolizadas, mientras que las gluteninas no fueron degradadas. Por otro lado, la concentración de aminoácidos aumentó en las masas especialmente prolina, ácidos glutámico y aspártico. La proteólisis por BAL durante la fermentación puede tener repercusiones sobre la reología de las masas por ello determinaron las propiedades reológicas de la masa y compararon la masa cultivada con BAL con una masa acidificada químicamente, los parámetros determinados con el extensógrafo, farinógrafo y álveografo indicaron un mejoramiento en el ablandamiento de la masa y su estabilidad durante la fermentación por BAL, la cual varió ligeramente dependiendo de la especie.

Dos estudios realizados (Di Cagno *et al.*, 2004; De Angelis *et al.*, 2005) en la elaboración de pan de masa agria mostraron que bacterias ácido lácticas (*lactobacilli*

de masas agrias y preparaciones probióticas comerciales) bajo condiciones específicas de procesamiento (fermentación de tiempo largo y semi-liquida) tienen la capacidad para hidrolizar la fracción de la gliadina del trigo.

Una masa hecha de una mezcla de trigo (30%) y harinas no tóxicas de avena, mijo y trigo sarraceno fue fermentada durante 24 h a 37°C, cultivada con *Lactobacillus alimentarius* 15M, *Lactobacillus brevis* 14G, *Lactobacillus sanfranciscensis* 7A y *Lactobacillus hilgardii* 51B con una concentración de 10⁹ UFC/g. Se observó mediante el análisis de electroforesis 2D que las prolaminas de harina de trigo desaparecieron completamente durante el tiempo de fermentación a la que fueron sometidas. Sin embargo las prolaminas de la avena, mijo y trigo sarraceno no fueron afectadas durante la fermentación de la masa. Al realizar una comparación con una masa acidificada químicamente y una masa cultivada sólo con levaduras, se observó que la hidrólisis en la masa agria fue debida a la actividad proteolítica de lactobacilli, mientras que las fracciones de prolamina no fueron modificadas por levaduras durante la fermentación (Di Cagno *et al*, 2004).

De Angelis *et al.*, (2005) realizaron un estudio con una preparación probiótica comercial VSL#3 compuesta de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum* y *B. infantis* con el objetivo de evaluar la capacidad de la preparación VSL#3 para hidrolizar las gliadinas de la harina de trigo, incluyendo polipéptidos responsables de la EC, como una herramienta para incrementar la tolerancia a trazas de gluten por pacientes celíacos.

Sus experimentos mostraron que la actividad enzimática de péptidos ricos en prolina y aminopeptidasas que determinan la hidrólisis de la gliadina, son ampliamente distribuidos por la preparación probiótica VSL#3. Después de 24 h de incubación a 37°C, 10⁹ células/g de VSL#3 hidrolizaron totalmente el péptido 33-mer causante de la EC (750 ppm). La hidrólisis de los polipéptidos de la gliadina durante la fermentación de la masa fue determinada por varias técnicas complementarias como electroforesis 2DE, análisis inmunológico (anticuerpos R5) y espectroscopía de masas (MALDI-TOF) en la que mostraron la degradación completa de las gliadinas durante la fermentación de tiempo largo de la harina de trigo. Dado esto,

concluyen que la actividad proteolítica de los probióticos puede tener gran importancia durante el procesamiento del alimento para producir una pre-digestión y tolerar las gliadinas, incrementando la palatabilidad de productos libres de gluten.

El mismo aprovechamiento descrito para el pan de masa agria de trigo fue adaptado para la elaboración de una pasta. Los mismos lactobacilli (*Lactobacillus alimentarius* 15M, *Lactobacillus brevis* 14G, *Lactobacillus sanfranciscensis* 7A y *Lactobacillus hilgardii*) fueron usados para prefermentar semolina de trigo durum bajo condiciones semi-liquidas, una pasta sin prefermentación fue usada como control. Los análisis realizados mostraron una completa hidrólisis de las gliadinas de trigo durum por las bacterias ácido lácticas durante la fermentación, la concentración de gluten disminuyó de 6280 ppm en la pasta control a 1045 ppm en la pasta fermentada, sin embargo esta concentración de gluten todavía puede provocar problemas a los EC, por lo que en este caso se encontró una disminución del gluten pero no la completa eliminación de la toxicidad (Di Cagno *et al.*, 2005).

Otro estudio realizado por De Angelis, *et al.*, (2006) con las especies de lactobacilli descritas anteriormente fueron usados para la fermentación de harina de centeno. La fermentación fue llevada a cabo bajo condiciones semilíquidas (30% de harina de trigo y 70% de agua) por tiempo largo de fermentación (24-48 h). Los mismos análisis realizados basados en electroforesis 2D y espectroscopia de masas MALDO-TOF mostraron que la mayor parte de los polipéptidos de centeno solubles en etanol fueron totalmente hidrolizados por las bacterias ácido lácticas.

Loponen, *et al* (2007) realizaron un estudio en el que evaluaron la hidrólisis de las prolaminas durante la fermentación de masas agrias de trigo germinado (GWSD) y los resultados obtenidos demuestran que la hidrólisis de las prolaminas ocurren en una alta actividad proteolítica de GWSD, todas las prolaminas del trigo (gliadinas y gluteninas) fueron degradadas durante la fermentación. La hidrólisis es atribuida a la actividad cisteina-proteinasa del trigo germinado. Por lo que el uso de masas agrias con alta actividad proteolítica en el horneado puede ser una alternativa para preparar nuevos productos de cereal bajos en prolaminas para el consumo de gente que es intolerante al gluten.

Rizzello, *et al.*, (2007) utilizaron *Lactobacilli* en masas agrias y proteasas fungales para eliminar la toxicidad de la harina de trigo durante la fermentación por un periodo de tiempo largo. Se observó que la cinética de hidrólisis por *Lactobacilli* fue altamente eficiente, además de que las proteínas extraídas de la masa agria indujeron la activación de interferón γ ; las albúminas, globulinas y gliadinas fueron completamente hidrolizadas, mientras que el 20% de gluteninas permanecieron en la masa agria. Ante esto concluyen que el procesamiento del alimento con *Lactobacilli* y proteasas fungales podrían ser consideradas como una perspectiva eficiente para eliminar la toxicidad del gluten.

Gobbetti, *et al.* (2007) menciona la necesidad de seleccionar las bacterias lácticas adecuadas para la fermentación ácida de las masas, así como el determinar los tiempos de acción necesarios para lograr la modificación de las gliadinas y la consecuente reducción de su toxicidad; esto pone en perspectiva acciones para la manufactura del pan.

Debido a la importancia que presenta la intolerancia al gluten en algunos seres humanos, en este trabajo se plantea el siguiente objetivo y su metodología para el proyecto de investigación.

2. OBJETIVO

Determinar el efecto de la composición del inóculo (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis* y *Lb. sanfranciscensis*) a diferentes tiempos de fermentación, en la reología de las masas agrias, por la modificación de la gliadina.

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se han realizado investigaciones respecto al efecto tóxico que causa en el hombre el consumo de proteínas de trigo; esta anomalía es conocida como enfermedad celiaca (EC) y se caracteriza por producir una mala absorción intestinal provocando diversos problemas nutricionales. El tratamiento efectivo para la EC es una estricta dieta libre de gluten. Sin embargo, los productos libres de gluten son escasos en México y generalmente se recurren a importaciones lo que involucra precios elevados además del costo social y emocional que sufren los

individuos que padecen la EC. Recientemente se han identificado a las gliadinas como la fracción proteica que presenta mayor toxicidad para éstos enfermos.

Debido a que la harina de trigo por su alto contenido en gliadinas es la más utilizada en la industria alimentaria y por lo tanto se encuentra presente en gran cantidad de productos alimenticios de consumo habitual, se ha evaluado que mediante la modificación de las gliadinas utilizando bacterias ácido lácticas en la fermentación de las masas agrias, los enfermos celíacos podrían consumir productos de trigo. Sin embargo en la actualidad los estudios del efecto de esta modificación en las propiedades reológicas de las masas de trigo y su efecto posterior durante la panificación, son escasos.

4. HIPOTESIS

Lactobacillus. sanfranciscensis, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*, son capaces de hidrolizar los fragmentos tóxicos de las proteínas del gluten que causan los síntomas de la enfermedad celíaca (EC), sin modificar las propiedades reológicas en masas agrias.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Estimación de la Cinética de crecimiento de los microorganismos

Los microorganismos utilizados fueron tres bacterias ácido lácticas del género *Lactobacilli*: *Lactobacillus brevis* CDBB-B-380, *Lactobacillus plantarum* CDBB-B1091 de la colección del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, D.F. (CINVESTAV) y *Lactobacillus sanfranciscensis* aislado de una bebida fermentada tradicional mexicana (pulque) donado por Universidad Iberoamericana (UIA). Cada una de las cepas fueron sembradas por estría cruzada en agar MRS (Difco) a 37°C en condiciones microerófilas.

Se preparo un inóculo estático, se tomaron 10 UFC de un cultivo de 24 h y se inocularon en un matraz Erlenmeyer conteniendo 70 ml de caldo MRS, se dejo a temperatura ambiente durante 10 horas y posteriormente se inóculo en un bioreactor Quimiostato (Multigen. New Brunswick scientific CO. INC. EDISON, N.J. USA) conteniendo 630 mL de caldo MRS (Difco). Cada dos horas se tomo muestra y se les midió la absorbancia en un espectrofotometro (CARY 50 Conc UV-visible Spectrophotometer) a 600 nm y se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC) mediante la técnica del número más probable, hasta alcanzar la fase exponencial de cada lactobacilo.

5.2. Preparación de inóculo para las masas agrias

Los microorganismos (*Lactobacillus brevis* CDBB-B-380, *Lactobacillus plantarum* CDBB-B1091 y *Lactobacillus sanfranciscensis*) fueron producidos en un cultivo continuo en Quimiostato (Multigen) a 37°C en caldo MRS y fueron recolectados cuando alcanzaron su fase logarítmica, por centrifugación (3500 rpm durante 10 minutos) se sometieron a dos lavados con una solución al 0.85% de NaCl. Posteriormente fueron resuspendidos en 100 mL de agua bidestilada estéril hasta alcanzar 10^9 UFC/mL por cada uno de los microorganismos. El inóculo fue agregado directamente a la harina.

5.3. Elaboración de Masas agrias

Se utilizo harina de trigo comercial (Hoja de plata, Harinas Elizondo, México) con 14% de proteína, 14 % de cenizas, 15% de humedad. La masa fue preparada con

un (DY) de 150, mezclando 400 de harina de trigo, 150 mL de agua bidestilada estéril y 50 ml de inóculo conteniendo 10^9 UFC/mL de cada una de las bacterias ácido lácticas, en combinaciones binarias, terciarias y solos. Las masas se sometieron a una fermentación de 24 horas a una temperatura de 30°C. Como control, se elaboro una masa acidificada químicamente con una mezcla de ácidos láctico y acético (proporción molar 4:1). (Paramithiotis, et al., 2005). Se tomaron muestras cada 6 horas (0, 6, 12, 18 y 24) y se le realizaron las siguientes pruebas:

5.4. Determinación pH y Acidez titulable

Se tomaron 10 g de masa agria, se homogeneizó con 90 mL de agua bidestilada estéril y se midio el pH con un potenciómetro digital (CONDUCTRONIC, S.A). La acidez titulable fue medida utilizando NaOH 0.1 N y expresado en ml de NaOH gastados. (Paramithiotis, et al. 2005)

5.5. Prueba de extensión biaxial

También fue evaluado el flujo extensional biaxial, sometiendo a las muestras a una deformación con una velocidad de desplazamiento constante de 0.3 mm/s y una compresión del 80% de su altura inicial, usando la prueba P100 (100 mm de diámetro) (Osorio *et al.* 2003). Los datos se recalcularon a esfuerzo vs. tiempo mediante la ecuación de Maxwell.

5.6. Prueba de extensión uniaxial

Se evaluó la extensibilidad uniaxial de las masas agrias utilizando un gancho SMS/Kieffer, también conocido como microextensógrafo (Dunnewind *et al.* 2004) las muestra fueron prensadas usando un molde estándar Kieffer durante 40 min, la velocidad de prueba fue de 3.3 mm/s y una fuerza de tracción de 5 g. En ambos casos se utilizó un texturómetro TA.XT2 (Texture Analyser, Stable Microsystems, RU).

5.7 Análisis microestructural por SEM

Se tomaron muestras cada 6 h durante la fermentación. El tamaño de las muestras fue de aproximadamente 2 cm x 2 cm X 0.5 cm. Las muestras se colocaron en un desecador conteniendo sílica gel y se desecaron al vacío, a temperatura ambiente durante 24 h (Varriano-Marston, 1977). Ya deshidratadas se sumergieron en nitrógeno líquido para facilitar su fractura. Se tomó una porción del centro de la

muestra, teniendo especial cuidado que no se incluyeran áreas cercanas a la superficie. La muestra se colocó en el portamuestras de tal manera de observar la cara fracturada y se adhirió con una cinta de carbón doble adhesiva y se recubrió con oro paladio utilizando una evaporadora Desk IV CTC Parker Modelo Standard (Denton Vacuum LLC. NJ, EUA). Se observaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6390LV (JEOL. Akishima, Japón), a un voltaje de 20kV. Las imágenes digitales se adquirieron utilizando un software Imix (Princeton Gamma Tech, Princeton, NJ). Se capturaron muchas imágenes en diferentes posiciones y en un rango de aumentos por muestra, seleccionándose para la discusión y observaciones las más representativas.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Cinetica de crecimiento de *Lactobacillus brevis* CDBB-B-380, *Lactobacillus plantarum* CDBB-B1091 y *Lactobacillus sanfranciscensis*

Las bacterias ácidas lácticas fueron cultivadas en caldo MRS para determinar el tiempo en que alcanzan su fase exponencial, debido a que en esta fase de crecimiento la bacterias tienen su mayor actividad proteolítica. También fue medida la absorbancia a una densidad óptica de 600 nm. En las figuras 1 y 2 se observa que la fase exponencial es alcanzada de 8-9 horas para las tres cepas.

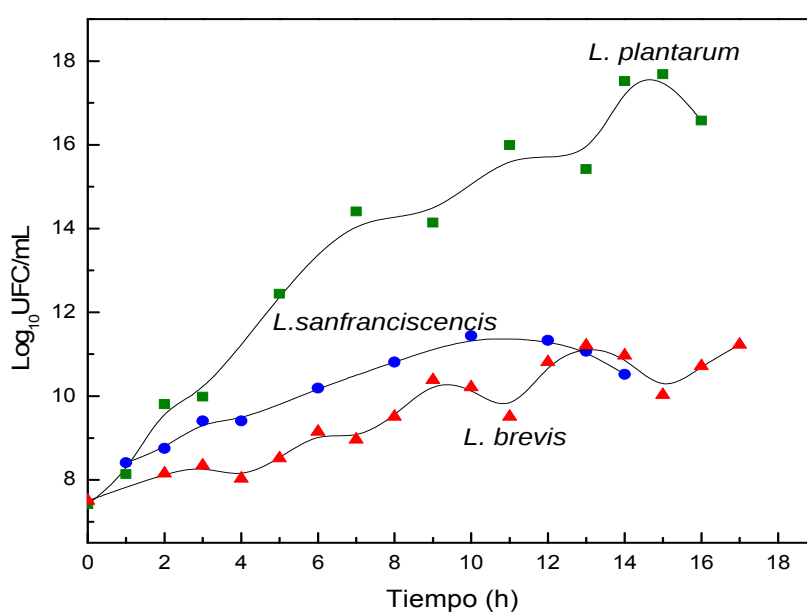


Figura 1. Cinetica de crecimiento de UFC/mL *Lactobacillus brevis* CDBB-B-380, *Lactobacillus plantarum* CDBB-B1091 y *Lactobacillus sanfranciscensis*

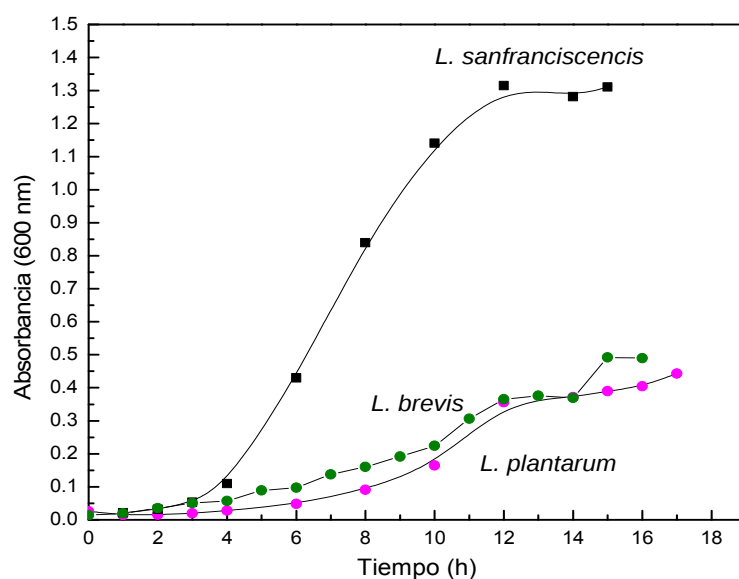


Figura 2. Cinética de crecimiento bacteriano determinado por método espectroscópico de *Lactobacillus brevis* CDBB-B-380, *Lactobacillus plantarum* CDBB-B1091 y *Lactobacillus sanfranciscensis*

6.2. pH y acidez de masas agrias

En el cuadro 1, se muestra el comportamiento de pH y acidez de cada uno de los lactobacilos y la mezcla de ellos durante la fermentación de masas agrias, observando que *Lb. plantarum* fue el que tuvo un pH más bajo de 3.75 y una acidez de 0.765% a las 24 horas, mientras que *Lb. brevis* y la masa fermentada con la mezcla de los tres microorganismos se tienen un pH de 4.07 y 4.01 respectivamente. En general se observa una disminución gradual de pH y un aumento de acidez.

Cuadro 1. Comparación de pH y acidez durante la fermentación de masas agrias por *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* y una mezcla de ellos.

Tiempo (h)	<i>Lb. sanfranciscensis</i>		<i>Lb. plantarum</i>		<i>Lb. brevis</i>		Mezcla		Control	
	pH	% acidez	pH	% acidez	pH	% acidez	pH	% acidez	pH	% acidez
0	6.24	0.027	6.21	0.027	6.21	0.027	6.32	0.018	4.21	0.072
6	5.17	0.045	4.91	0.09	5.7	0.036	5.58	0.045	4.07	0.171
12	4.2	0.252	3.97	0.405	4.82	0.135	4.23	0.261	4.06	0.315
18	4.02	0.423	3.83	0.45	4.26	0.18	4.17	0.288	4.10	0.387
24	3.95	0.612	3.75	0.765	4.07	0.477	4.01	0.693	4.12	0.495

La consistencia de la masa agria puede variar en función de su contenido de agua. Así, la masa agria puede ser una suspensión líquida o bien una masa firme. La proporción que guardan la harina y el agua es llamada rendimiento de masa (RM) y está definida por:

$$RM = (\text{cantidad de harina} + \text{cantidad de agua}) \times 100 / \text{cantidad de harina}$$

Para una masa agria con un RM de 160, significa que se trata de una masa firme, mientras que una con un valor RM de 200 correspondería a una masa líquida. La masa experimental de este estudio tuvo un valor de RM de 150 que se refiere a una masa con firmeza.

Se ha informado que entre menor sea el valor RM se produce más ácido acético que láctico, afectando con ello el sabor del producto final. Valores altos de RM aceleran la tasa de acidificación (Decokk y Cappelle, 2005). Vernocchi *et al.*, (2008), mostraron el efecto del RM sobre la microestructura de las masas, observada por SEM; a altos valores de RM (220, masa líquida), la matriz proteínica no se aprecia continua y los gránulos de almidón no se mantienen en esa estructura, en cambio, con valores de 146 (masa sólida), se observa una matriz más coherente y continua donde los gránulos de almidón quedan embebidos en ella. En contradicción con Decokk y Cappelle (2005), encontraron una producción de ácido acético trescientas veces mayor en las masas con RM de 220 que en las de 146.

Cabe mencionar que, aunque en el presente trabajo no se cuantificó la presencia de ácido acético, no se percibió un franco aroma de este tipo de ácido, más bien los aromas detectados se parecían más a los que producen los alcoholes. Vernochhi *et al.*, (2008) informan que en masas fermentadas con *Lb. sanfranciscensis*, cuyo RM es de 146, dos de los principales metabolitos producidos fueron etanol y l-hexanol.

En el presente experimento, la cantidad de agua utilizada para cada masa con cada tipo de microorganismo, se mantuvo constante, así que las tres masas correspondieron a masas firmes con un valor de RM=150, como ya fue mencionado antes. Entonces, los cambios en los valores de pH de la masa observados durante la

fermentación, pueden ser atribuibles al tipo y cantidad de metabolitos producidos por cada microorganismo utilizado (cuadro 1).

La tasa de acidificación de las masas durante las primeras 12 h de fermentación, se ajustó a un modelo lineal y el más alto valor correspondió a la masa fermentada con *Lb. plantarum* (-0.186, R= 0.995), seguida de para *Lb. sanfranciscensis* (-0.17, R= 0.999) y por último, la masa fermentada con *Lb. brevis* (-0.115, R= 0.988). Después de las 12 h de fermentación, la caída en el pH fue menor hasta terminar con valores de pH similares al alcanzar las 24 h. Wick *et al.*, (2001) mencionan que *Lb. plantarum* es una bacteria homofermentativa, que produce solamente ácido láctico durante la fermentación, mientras que *Lb. brevis* es heterofermentativa, por lo que produce ácido acético y etanol entre sus metabolitos principales, ello podría explicar que la masa fermentada con *Lb. plantarum* disminuyera más rápido y en mayor medida el pH de la masa ya que el ácido láctico es más fuerte que el acético ($pK_a=3.5$ y $pK_a=4.76$ respectivamente).

Los valores de pH alcanzados al final de la fermentación, fueron ligeramente mayores a los informados por Thiele *et al.*, (2004) para masas fermentadas con *Lb. sanfranciscensis*. Wick *et al.*, (2001) informaron un pH de alrededor de 3.3 en estudios de crecimiento de *Lb. brevis* en caldo MRS, durante 35 h, valor que se mantuvo constante desde las 25 h de reacción, teniendo un pH inicial de 6.0. La masa tratada con *Lb. brevis* terminó con un valor de pH ligeramente más elevado y fue la de mayor valor de pH final, en relación con las masas fermentadas con los otros microorganismos (cuadro1). Cuando los microorganismos se encuentran en sistemas complejos, altamente viscosos como las masas agrias, las bacterias quedan atrapadas dentro de la matriz que conforma el sistema. Puede plantearse la hipótesis de que la difusión de nutrientes y metabolitos es lenta, lo cual afecta el desarrollo y metabolismo de las bacterias (Vernocchi *et al.*, 2008).

6.3. Propiedades visco elásticas de masas agrias

6.3.1. Extensibilidad biaxial

La fermentación es un importante paso en el proceso de la elaboración de pan, donde la expansión de burbujas de aire previamente incorporado durante el mezclado que provee las características de una estructura esponjosa del pan. Aunque la fermentación es muy importante durante el proceso del pan, existen pocos estudios sobre las propiedades reológicas de las masas durante la fermentación (Dobraszczyk y Morgenstern, 2003). Por consiguiente, se evaluó la extensión biaxial producida por una compresión uniaxial, pero se toma usualmente como un flujo que produce un esfuerzo de tensión radial.

Las propiedades mecánicas de un alimento pueden expresarse en términos de funciones viscosas, elásticas y viscoelásticas. Las masas de harina de trigo sufren cambios durante el proceso, estos cambios tienen efectos significantes sobre el comportamiento mecánico y la calidad del producto final. La variación en el potencial de retención de gas entre las masas de harina de trigo es principalmente debido a las diferencias de las propiedades de deformación de la masa.

La ecuación que describe el comportamiento líquido visco elástico está basada en el modelo de Maxwell. La deformación de corte en un elemento fluido de Maxwell es igual a la suma de la deformación del componente elástico (resorte) y viscoso (amortiguador).

$$\gamma = (\gamma)_{spring} + (\gamma)_{dashpot} \quad (1)$$

Diferenciando la ecuación 1 con respecto al tiempo

$$\frac{d\gamma}{dt} = \gamma \frac{1}{G} \left(\frac{d\sigma}{dt} \right) + \frac{\sigma}{\mu} \quad (2)$$

o

$$\sigma + \lambda_{rel} \left(\frac{d\sigma}{dt} \right) = \mu \dot{\gamma}$$

(3)

Donde el tiempo de relajación es definido como:

$$\lambda_{rel} = \frac{\mu}{G} \dots\dots\dots (4)$$

La ecuación 4 puede ser definido como el tiempo que tarda una macromolécula al ser estirada cuando se deforma. Estas ecuaciones son presentadas en forma de deformación de cizalla. Si las pruebas conducen a una tensión uniaxial o compresión, el tiempo de relajación puede ser en términos de una viscosidad extensional (η_E) y modulo de Young (E).

El modelo de Maxwell es útil para entender los datos de relajación de esfuerzo. Considerando un experimento de esfuerzo donde hay una repentina aplicación de una tensión cortante constante, γ_0 .

Cuando la defromación es constante, la velocidad de corte es igual a cero ($\dot{\gamma} = 0$) y la ec. 3 es:

$$\sigma + \lambda_{rel} \left(\frac{d\sigma}{dt} \right) = 0$$

Esta ecuación puede ser integrada usando la condición inicial $\sigma = \sigma_0$ a $t = 0$

$$\int_{\sigma_0}^{\sigma} \frac{d\sigma}{\sigma} = \int_0^t -\frac{dt}{\lambda_{rel}}$$

O, evaluando la integral,

$$\sigma = f(t) = \sigma_0 \exp\left(\frac{-t}{\lambda_{rel}}\right)$$

Esta ecuación describe la relación de esfuerzo gradual (de σ_0 a cero) después de la aplicación de una repentina deformación. La relación proporciona un medio para determinar el tiempo de relajación: λ_{rel} es el tiempo para que el esfuerzo decaiga a $1/e$ (aproximadamente 36.8%) de su valor inicial.

En las figuras 3-7 se observa el comportamiento de las masa agrias a diferentes tiempos de fermentación utilizando el modelo de Maxwell que representa al liquido viscoelástico ideal en la aplicación de la menor fuerza producirá un flujo. En el

modelo de Maxwell los elementos tanto viscoso como elásticos soportan la misma fuerza de tensión. Las graficas de esfuerzo deformación en función del tiempo puede apreciarse el incremento de módulo de alargamiento al estíralo donde interviene el componente elástico.

En la figura 3 se observa comportamiento de la masa agria fermentada con *Lb. brevis* durante 24 h; cada 6 horas se sometieron a una prueba de compresión biaxial, observando que conforme aumenta el tiempo de fermentación aumenta el esfuerzo necesario para que las masas sufran una deformación. Al tiempo cero se tiene un esfuerzo de 28.311 Pa, mientras que a las 24 horas se tiene un esfuerzo de 8062.7 Pa, entre 6,12 y 18 horas (29721, 9865.4 y 6743.7Pa, respectivamente) la masa sufrió cambios muy significativos.(Cuadro 2)

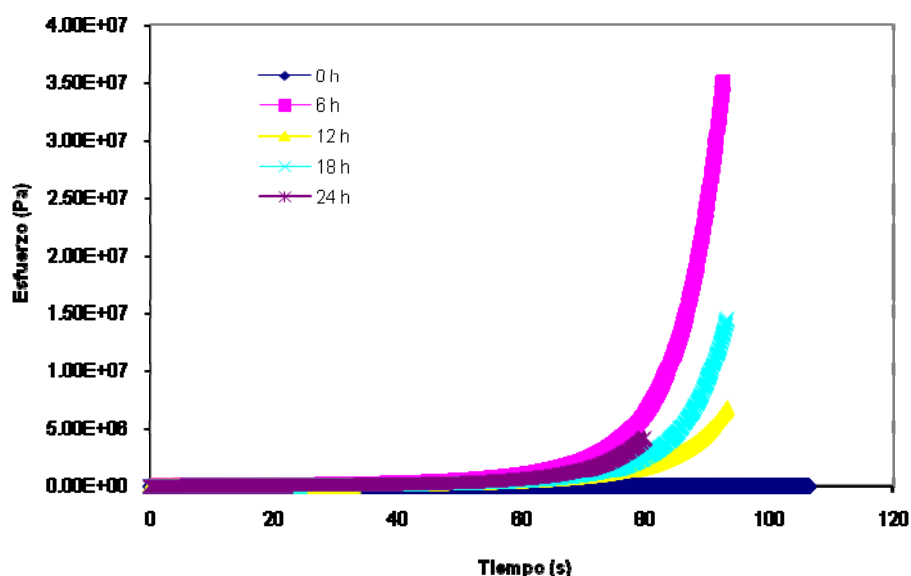


Figura 3. Curvas esfuerzo vs tiempo de masas agrias inoculadas con *Lb. brevis* a diferentes tiempos de fermentación

Por otro lado, figura 4 se observa el mismo comportamiento en la masa fermentada con *Lb. plantrarum*, teniendo al tiempo cero un esfuerzo de 33.598 Pa mientras que al as 24 horas tiene 12255 Pa. Así mismo, en las masas fermentadas con *Lb. sanfranciscencis* y la masa producida con la mezcla de los tres microorganismos también se observa el mismo comportamiento, aumenta el esfuerzo necesario para comprimir conforme aumenta el tiempo de fermentación teniendo al tiempo cero 24.295 Pa, mientras que a las 24 h setien 14291 Pa. (Figura 5, Cuadro 2)

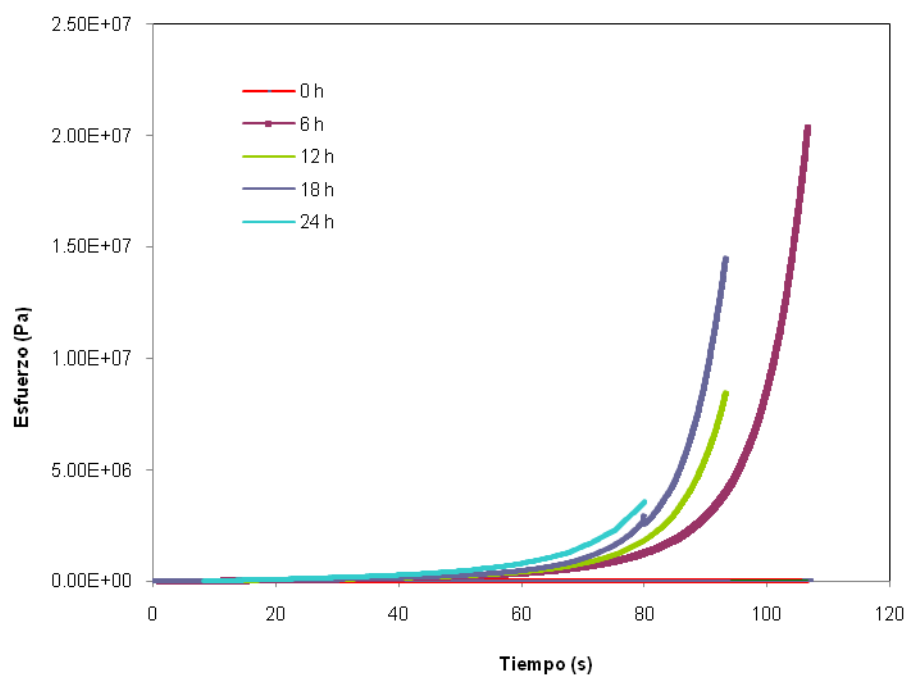


Figura 4. Curvas esfuerzo vs tiempo de masas agrias inoculadas con *Lb. plantarum* a diferentes tiempos de fermentación

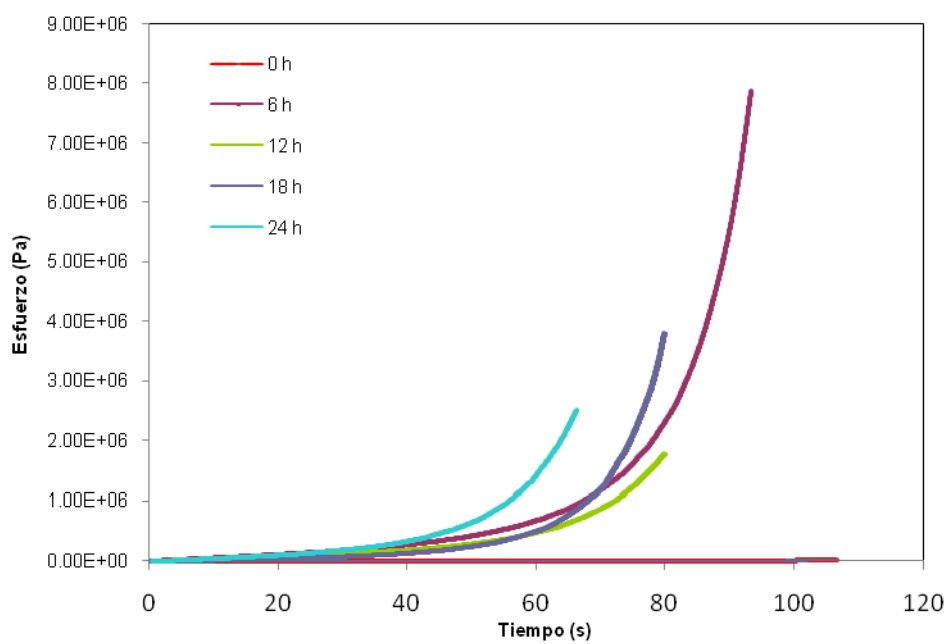


Figura 5. Curvas esfuerzo vs tiempo de masas agrias inoculadas con *Lb. sanfranciscensis* a diferentes tiempos de fermentación

En las masas agrias fermentadas con los tres microorganismos (mezcla) y el control (Figuras 6 y 7) se observa que tienen un esfuerzo a las 0 h de 39.81 y 42.742 Pa, mientras que al final de la fermentación (24 h) tienen 13.7551 y 3938.Pa, respectivamente. (Cuadro 3).

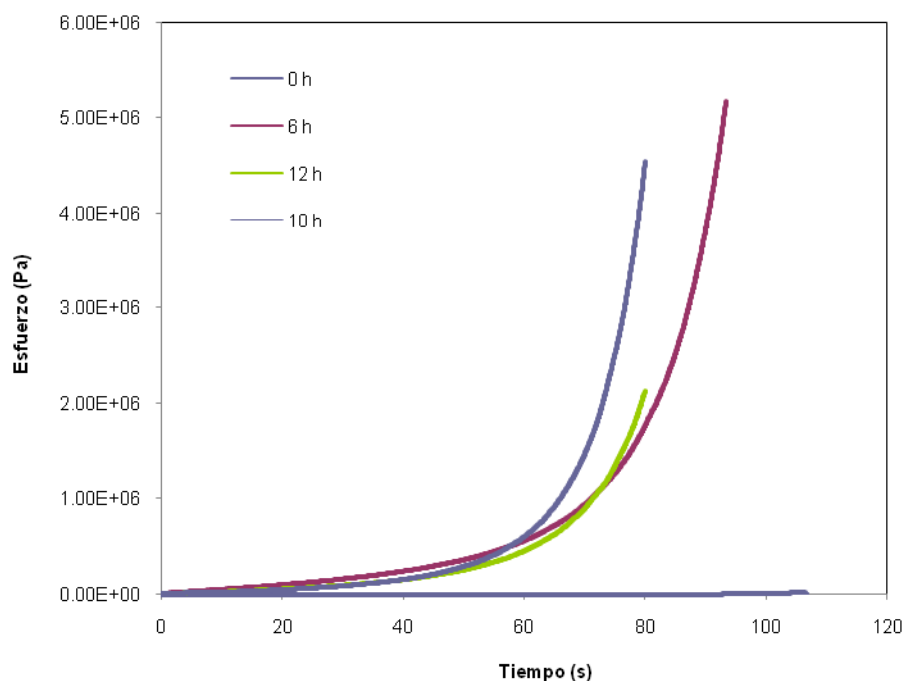


Figura 6. Curvas esfuerzo vs tiempo de masas agrias inoculadas con *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* y *Lb. sanfranciscensis* a diferentes tiempos de fermentación

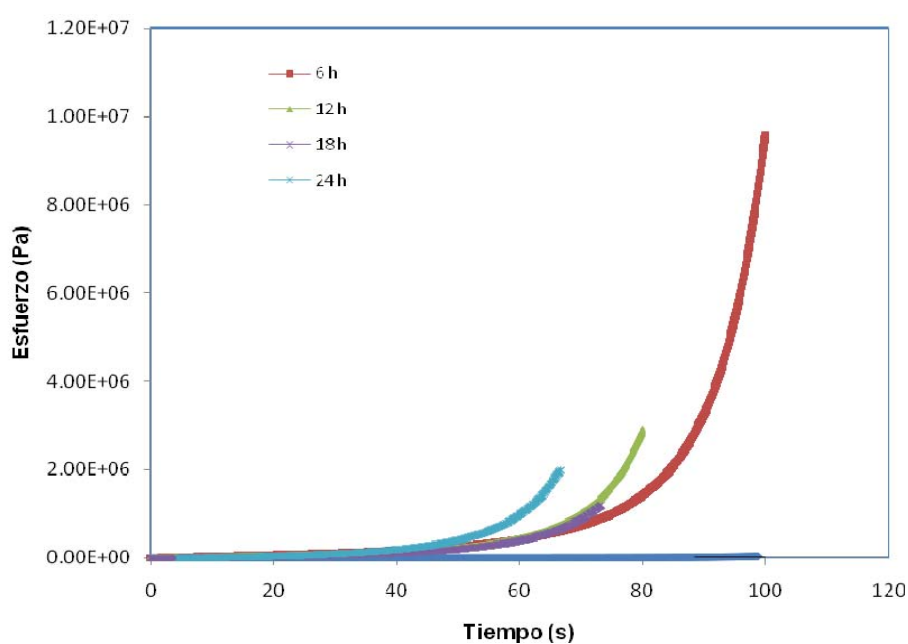


Figura 7. Curvas esfuerzo vs tiempo de masas agrias acidificada químicamente diferentes tiempos de fermentación

Cuadro 2. Comparación entre el esfuerzo (σ_0) y la relación entre el componente viscoso/elástico (λ_{rel}) de las masas agrias inoculadas con lactobacilos durante diferentes tiempos de fermentación.

Tiempo (h)	<i>Lb. brevis</i>		<i>Lb. plantarum</i>		<i>Lb. sanfranciscensis</i>	
	σ_0	λ_{rel}	σ_0	λ_{rel}	σ_0	λ_{rel}
0	28.311	19.1204589	33.598	18.1488203	24.295	18.115942
6	29721	15.3609831	7740.1	14.8367953	24649	17.2413793
12	9865.4	15.128593	5065.6	13.2275132	11914	15.6985871
18	6743.7	13.3868809	6682.5	13.2802125	4776.4	12.3762376
24	8062.7	13.2625995	12255	14.0056022	14191	12.6903553

Cuadro 3. Comparación entre el esfuerzo (σ_0) y la relación entre el componente viscoso/elástico (λ_{rel}) de las masas agrias (mezcla y control) durante diferentes tiempos de fermentación.

Tiempo (h)	Mezcla		control	
	σ_0	λ_{rel}	σ_0	λ_{rel}
0	39.81	20.5338809	42.742	16.5016502
6	25686	18.5873606	18271	17.7619893
12	10746	15.5279503	9312.6	14.9031297
18	8964.1	13.7551582	4318.6	12.8865979
24			3938.1	10.5485232

El comportamiento viscoelastico pueden visualizarse como una dispersión de piezas elásticas de la red en una disolución o como una red elastica tridimensional que tiende a degradarse con mayor o menor facilidad.

Como ya se ha mencionado, durante la panificación al ser hidratada la harina de trigo se forma una red tridimensional con características viscoelásticas. En la Figura 8 se muestra la relación del comportamiento viscoso y elástico de las masas agrias conforme aumenta el tiempo de fermentación, en general se observa que conforme aumenta el tiempo de fermentación las masas pierden su componente elástico. debido a que la red tridimensional elástica se desintegra bajo el efecto de la tensión, cuanto más compleja y resistente sea esta red, será más pronunciada la elasticidad. Debido a la discontinuidad del componente elástico se produce un flujo más viscoso.

Al final de la fermentación las masas presentaban mayor viscosidad ya que fácilmente se desintegraba la red. En la masa de harina de trigo se da una relajación

bajo el efecto de la tensión, se piensa que es debida a la sucesiva ruptura de los enlaces cruzados seguida de su neoforación para dar una configuración menos forzada. De este modo desaparece la tensión y se mantiene la integridad de la estructura total. En la masa, el mecanismo responsable fundamental de la relajación es, probablemente un intercambio disulfuro-sulfidrilo.

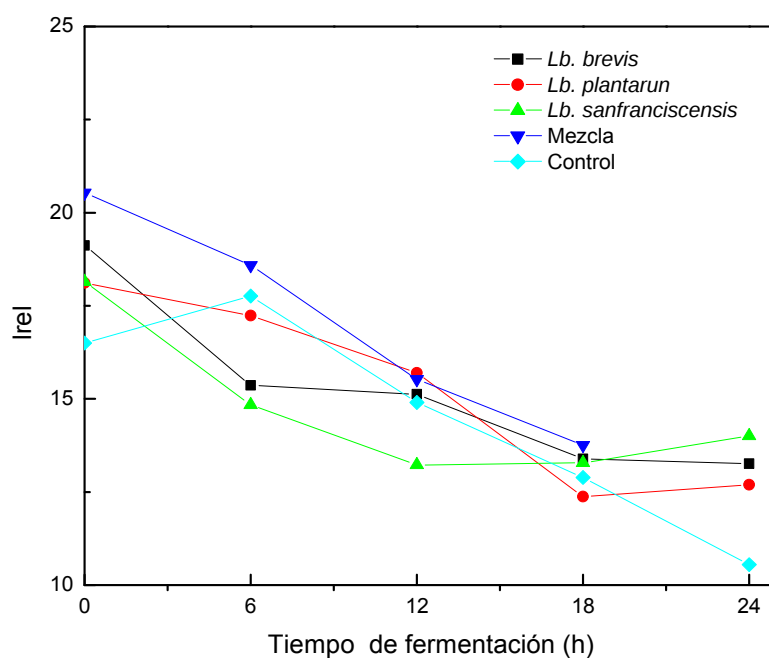


Figura 8. Relación entre el componente viscoso y elástico (λ_{rel}) de la masa con respecto al tiempo de fermentación

Se pudo apreciar los cambios de conformación de la masa ya que al tiempo cero, no es apreciable la elasticidad debida al estiramiento de los enlaces interatómicos y puede afirmarse que la elasticidad de los alimentos viscoelásticos se debe a la deformación elástica de las macromoléculas, debido a que un material deba poseer elasticidad debe estar constituido por moléculas de cadena larga cuyos enlaces puedan rotar libremente, tener fuerzas intermoleculares débiles y poseer en unos cuantos puntos a lo largo de la cadena macromolecular, fuertes enlaces cruzados intermoleculares resultado un conjunto de características de una red tridimensional.

Debido a que propiedades de la harina de trigo radica principalmente en la cantidad de proteínas para formación del gluten, los resultados de la prueba extensional biaxial en las masas fermentadas con *Lactobacilli* indican que debido a la actividad proteolítica las proteínas sufrieron hidrólisis afectando la estructura del gluten. Existen investigaciones en el que demuestran que existe una degradación de

proteínas en masa agrias fermentadas con BAL, incrementando la concentración de aminoácidos en la masa (Ganzle, et al. 2007).

Generalmente, las enzimas proteolíticas, proteinasas catalizan la degradación de la proteínas a pequeños péptidos; en cambio las peptidasas hidrolizan enlaces específicos o rompen completamente los péptidos a aminoácidos. En un estudio realizado por Gerez et al, (2006) evaluó el crecimiento y las actividades metabólicas de lactobacilli heterofermentativos demostrando que *Lb. plantarum* hidrolizo un 73% de péptidos causantes de la intolerancia al gluten. Por otro lado, Thiele, et al, (2003) reporta que *Lb. sanfranciscensis* utiliza péptidos durante su crecimiento en masas agrias.

6.3.2 Extensibilidad uniaxial de masas agrias.

Por otro lado, también se evaluó la extensión uniaxial, la cual es un método ampliamente utilizado para medir las propiedades de los materiales en una prueba de tensión uniaxial donde el material se extiende en una dirección con una reducción de tamaño en las otras direcciones realizado en un micro sistema Kieffer donde una tirita de la muestra es colocada en una placa sujetando los ambos extremos, la fuerza es medida al mismo tiempo que el desplazamiento de la muestra. La fuerza es generalmente graficada contra el desplazamiento extensión para obtener una curva de fuerza-extensión (Dobraszczyk y Morgenstern, 2003).

Generalmente, una buena masa panera debe tener valores de alrededor de 60g de resistencia a la extensión y alrededor de 14-15 cm de extensibilidad. Por lo que, una masa para la elaboración de pan necesita tener una buena proporción entre la fuerza máxima necesaria para extensión y la extensibilidad que es la distancia recorrida de la muestra antes de su ruptura para que el pan tenga un buen volumen el pan (Dobraszczyk y Morgenstern, 2003).

En las figuras 8 y 9, se observa el comportamiento de extensibilidad uniaxial de las masas agrias inoculada con *Lb. brevis*, *L. plantarum*, donde se observa que conforme aumenta el tiempo de fermentación disminuye la resistencia a la extensión así como la extensibilidad, ya que para *Lb. brevis* al tiempo cero tiene una distancia

de 75 mm de extensibilidad y 46.4g de resistencia a la extensión mientras que a las 24 horas, tiene 44.828 mm de extensibilidad y 7.4 g de resistencia a la extensión. Por otro lado, la masa fermentada con *Lb. brevis* durante las primeras 12 horas mantiene una extensibilidad de 75mm finalizando a las 24 h con una extensibilidad de 70.451mm, mientras que conforme aumenta el tiempo de fermentación disminuye la fuerza necesaria requerida para la extensión teniendo a las 0 h, 37.6gf y finalizando la fermentación (24) tiene 247.7gf.

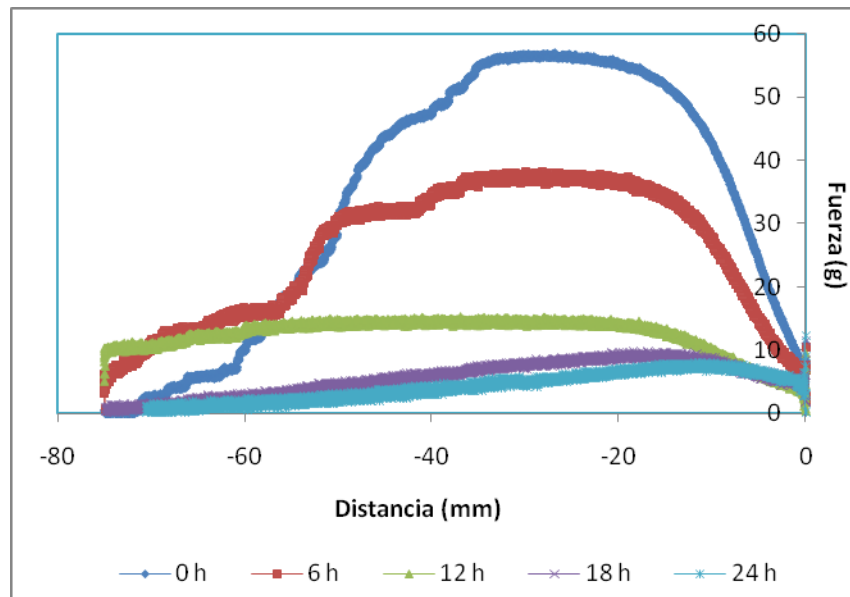


Figura 9. Extensibilidad de masas agrias inoculada con *Lb. brevis* a diferentes tiempos de fermentación

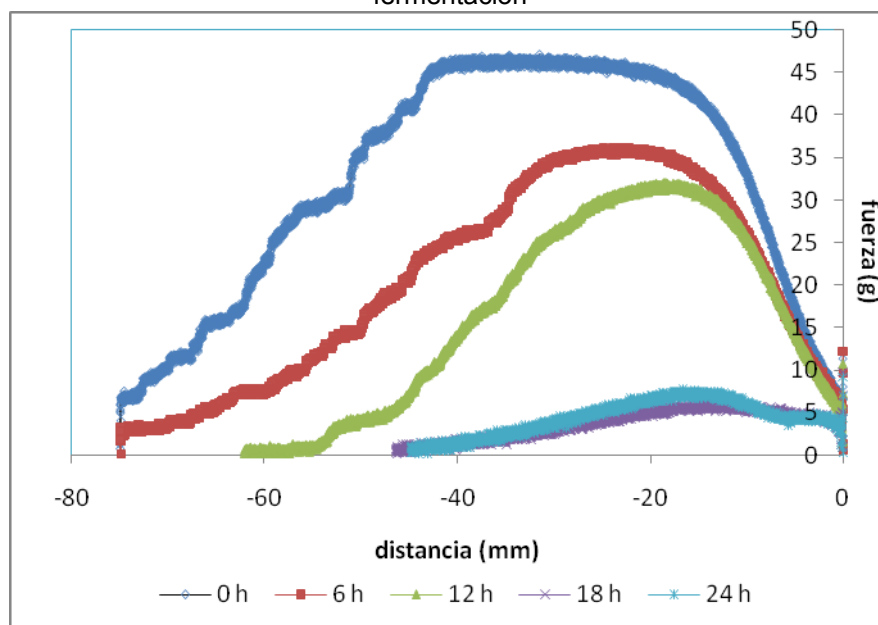


Figura 10. Extensibilidad de masas agrias inoculada con *Lb. plantarum* a diferentes tiempos de fermentación

La masa fermentada con *Lb. sanfranciscensis* (Figura 9), al tiempo cero tiene una extensibilidad de 75 mm y un fuerza de 41g mientras que a las 24 horas la extensibilidad y la fuerza disminuyen a 43.192 mm y 5.2 gf, respectivamente. Se observa que se tiene el mismo comportamiento en las tres masas inoculadas con cada uno de los microorganismos disminuyendo la extensibilidad y la fuerza requerida para la extensión, sin embargo la masa inoculada con *Lb. brevis* fue la masa que tuvo una pérdida de extensibilidad menor (1.23%), seguida de la masa fermentada con *Lb. plantarum* (9.86%) y finalmente la masa fermentada con *Lb. sanfranciscensis* (10.5%).

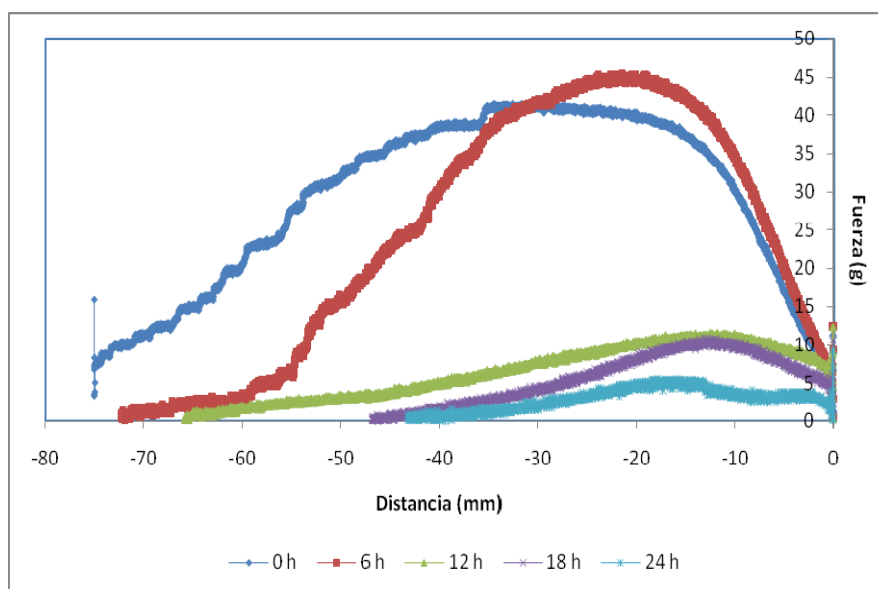


Figura 11. Extensibilidad de masas agrias inoculada con *Lb. sanfranciscensis* a diferentes tiempos de fermentación

En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos de extensibilidad uniaxial de la masa fermentada con una mezcla de los tres lactobacilos (*Lb. brevis*, *Lb. plantarum* y *Lb. sanfranciscensis*), donde se observa que al tiempo cero se tiene una masa con poca extensibilidad (47.088mm) comparándola con las masa fermentadas con un solo microorganismo, al final de la fermentación tiene un extensibilidad de 41.362 mm disminuyendo un 2% de su extensibilidad inicial, mientras que disminuyo un 20% la resistencia de la masa a la extensión.

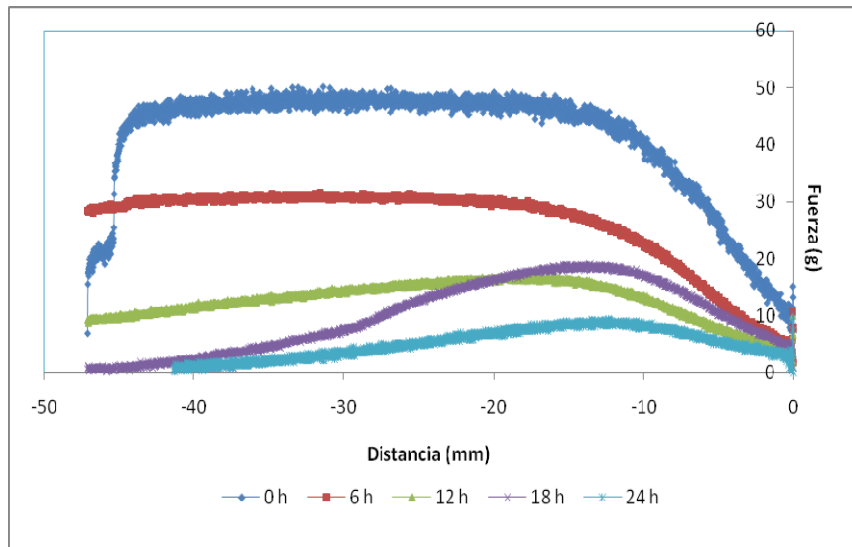


Figura 12. Extensibilidad de masas agrias inoculada con la mezcla de los tres microorganismos (*Lb. brevis*, *Lb. plantarum* y *Lb. sanfranciscensis*) a diferentes tiempos de fermentación

También se evaluó una masa fermentada químicamente (relación molar 4:1 de ácido láctico y ácido acético) como control (Figura 10), en esta masa su extensibilidad disminuyó 5.69% en cambio la fuerza disminuyó un 55.02%, siendo la masa que menos resistencia tiene a la extensión a las 24 horas comparándola con las masas fermentadas con lactobacilos, por otro lado la masa que perdió menos extensibilidad fue la masa inoculada con *Lb. brevis*. Esto indica que durante la fermentación de las masas se va perdiendo su estabilidad debido a la ausencia del componente elástico.

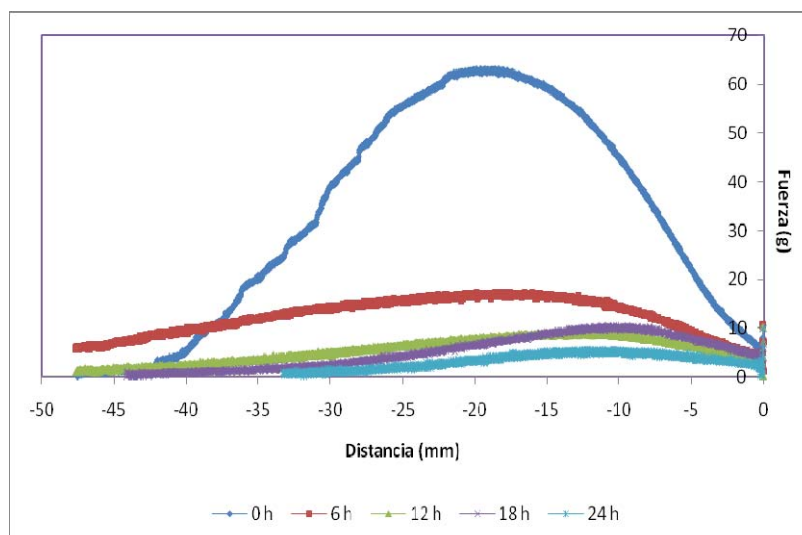


Figura 13. Extensibilidad de masas agrias acidificadas químicamente a diferentes tiempos de fermentación

Las proteínas del gluten y los cambios reológicos y funcionales son de gran importancia para la fabricación de pan. Peña et al (2005) reportó la correlación entre las propiedades reológicas de masa de trigo, donde menciona que las propiedades de masa dependen del balance glutenina/gliadina y del tipo y cantidad de proteínas en el endospermo. Los resultados obtenidos en ambas pruebas tanto biaxial como uniaxial que hubo una modificación estructural en las masa indicando que las proteínas del gluten sufrieron una degradación.

Por otro lado, Wikstrom (1997) estudió el flujo extensional de masa de trigo para relacionar las propiedades reológicas de la masa y el gluten con su procesamiento y concluyó que las propiedades de flujo de la masa de trigo dependen de la deformación y la velocidad de deformación, además encontró que existe una amplia variación de los resultados de la viscosidad extensional biaxial de las masas elaboradas con diferentes cultivos. En este estudio se pudo constatar que *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* y *Lb. sanfranciscensis* tienen el mismo comportamiento ya que en todas las masas conforme transcurría el tiempo las masa fermentadas perdían su componente elásticas teniendo a las 24 h masa viscosas.

5.7 Analisis morfológico de las masas agrias

El análisis de la microestructura de las masas usando microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés), ha sido probado como una herramienta útil para revelar aspectos de la formación y ruptura de la estructura.

De manera general, las estructuras observadas de las diferentes masas experimentales revelaron la presencia de una estructura densa con pocos huecos esféricos y con los gránulos de almidón embebidos en una matriz proteínica continua que forma capas y estructuras tridimensionales tipo esponja. Los huecos esféricos corresponden a celdas de gas de diversos tamaños. Los gránulos de almidón varían en tamaño (figura 2).

La presencia de BAL en las masas y su producción de ácido, afectan la estructura de la misma, como lo revelan las micrografías obtenidas en diferentes momentos de la fermentación. En un principio ($t=0$ y $t=6$) los gránulos de almidón, densamente distribuidos, se encuentran cubiertos por la matriz proteínica. A medida que

transcurre la fermentación, el efecto más considerable es observado sobre la matriz proteínica. Al inicio del proceso, se llegan a observar los gránulos de almidón recubiertos por la matriz densa, para ir quedando descubiertos a medida que la fermentación ha transcurrido (figura 3)

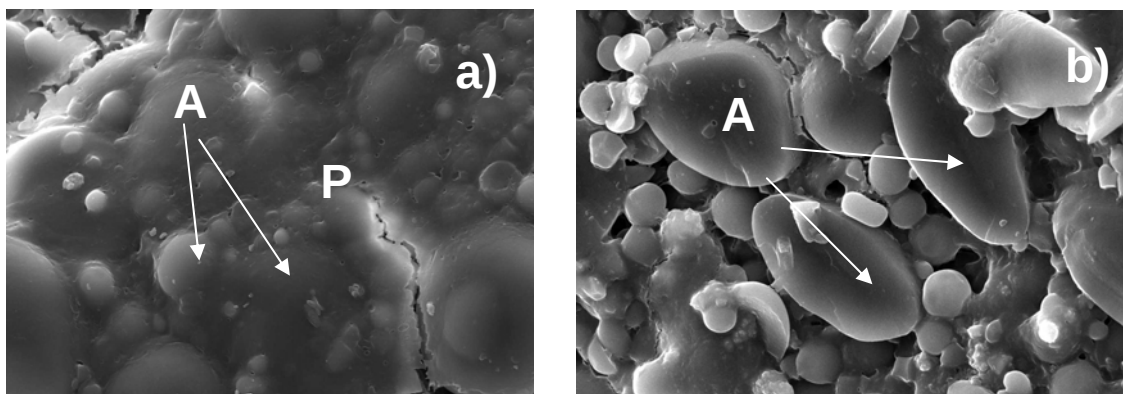


Figura 14. Microestructura de masas: a) $t=0$ de fermentación y b) $t=24$ h

Barber *et al.*, (1992) plantearon la hipótesis de que podría haber una hidrólisis parcial del almidón en los sistemas de masa agria, aunque esto no es posible apreciarlo en las micrografías. Di Cagno *et al.*, (2002), han informado de la asociación positiva entre las BAL y los pentosanos presentes en las harinas de trigo. Mientras, Zotta *et al.*, (2007) mencionan que el sistema proteolítico de las BAL puede hidrolizar las proteínas en pequeños péptidos y aminoácidos los cuales son importantes para el rápido crecimiento de las BAL. En la figura 3b), es evidente la degradación que sufrió la matriz proteínica por efecto de la fermentación después de 24 h, al compararla con la microestructura de una masa recién elaborada (fig 3a).

Además, por la disminución del pH (cuadro1) en la masa, debido a la producción de ácido láctico y acético, se ha informado la inducción de una mayor actividad en las enzimas que contiene la harina de trigo, intensificando la modificación de la matriz proteínica. Bleux *et al.*, (1997) describieron que las proteasas de los cereales tienen un pH de actividad óptima de 4. Thiele *et al.*, (2002) también informa un incremento en el grado de proteólisis en sistemas acidificados de masas.

Durante la fermentación, la producción de ácidos puede afectar las actividades metabólicas de las BAL y afectar su comportamiento. Cabe mencionar que las respuestas al daño por presencia de ácidos, puede ser diferente dependiendo del tipo de BAL.

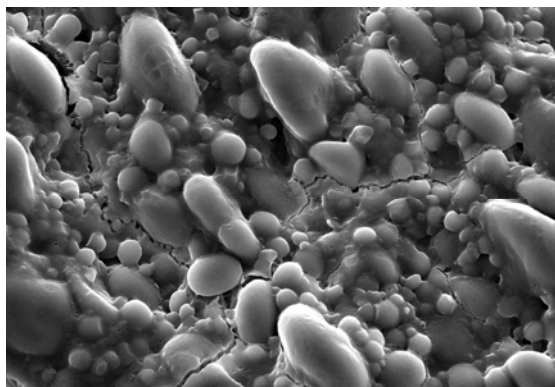
Es importante considerar que los granos de cereales, además del almidón, contienen otro tipo de polisacáridos, representados por β -glucanos, polifruktanos, arabinoxilanos y fructooligosacáridos del tipo inulina, cuyo efecto prebiótico ha sido documentado, lo cual puede favorecer el desarrollo de las BAL. Éstas a su vez, secretan metabolitos polisacáridos al medio (exopolisacáridos EPS), que mejoran las características de los productos de panificación (Corsetti y Settanni, 2007).

La presencia de *Lb. sanfranciscensis* en las masas agrias, se ha caracterizado por su contribución para mejorar el contenido de polisacáridos, debido a su producción de EPS (Korakli *et al.*, 2002). La presencia de EPS en las masas agrias, influye en la viscosidad de las mismas. Este efecto fue observado en las masas experimentales, que a medida que transcurría la fermentación, se incrementaba su viscosidad y “pegajosidad”.

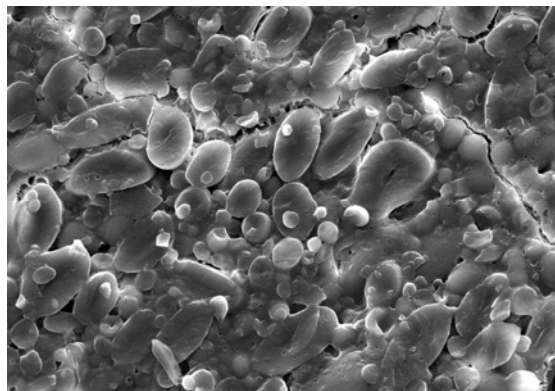
Un beneficio de la presencia de los EPS, es que pueden actuar como prebióticos de las bifidobacterias presentes en el yeyuno, las cuales se encuentran entre las bacterias con mayor actividad probiótica para el humano (Modler, 1994).

Las BAL pueden producir tanto heteropolisacáridos como homopolisacáridos con diferentes monosacáridos de origen. Ketabi *et al.*, (2008) encontraron un incremento de 142.3% y de 155.6% de xilosa y arabinosa respectivamente, en masas agrias, en relación con un control. Ello tiene un efecto en el incremento de la absorción de agua por la masa, medido en un farinógrafo. Mencionan que como polisacáridos, son los arabinoxilanos los que modifican, en mayor extensión, las propiedades de la masa y de su producto final. En pruebas extensográficas, encontraron que a medida que se incrementa la proporción de EPS en la masa, ésta disminuye su resistencia a la extensión. Estos autores también señalan que mayores tiempos de fermentación permiten una mayor estabilidad en la masa.

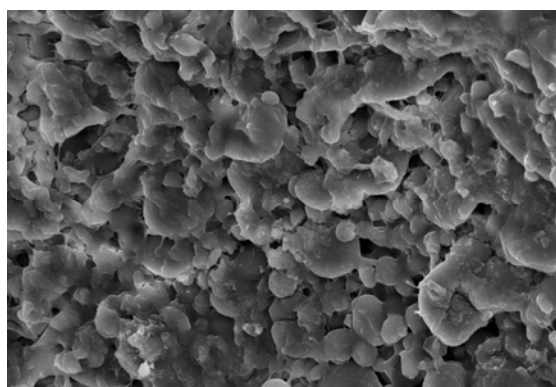
A continuación se muestran las micrografías obtenidas para cada tiempo de fermentación y para cada tipo de microorganismo utilizado. Todas ellas corresponden a un aumento de 1000x.



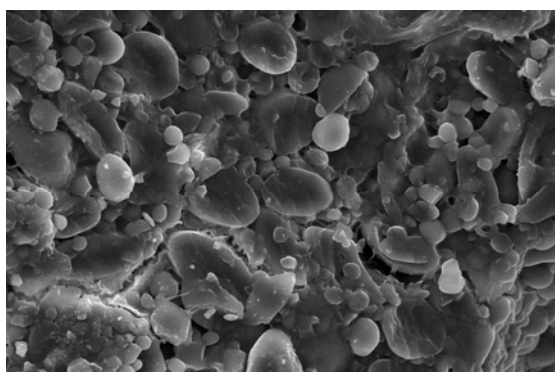
t=0



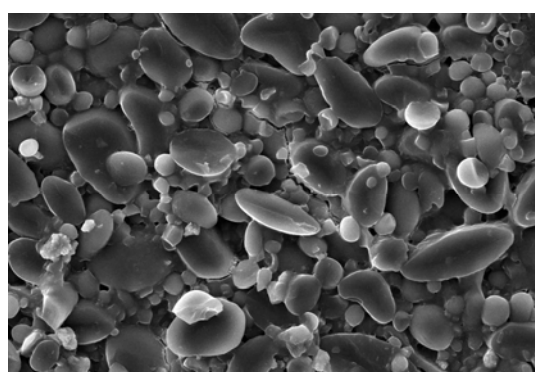
t=6h



t=12h

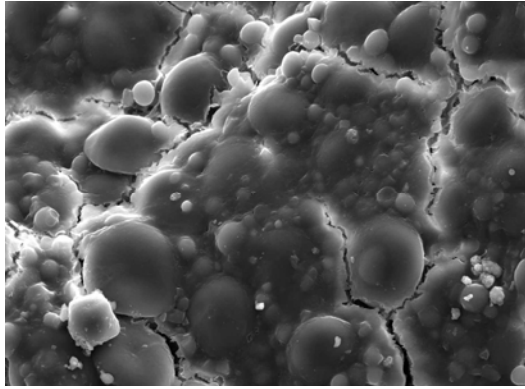


t=18h

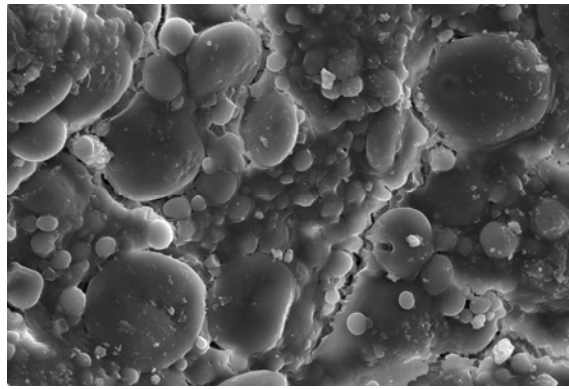


t=24h

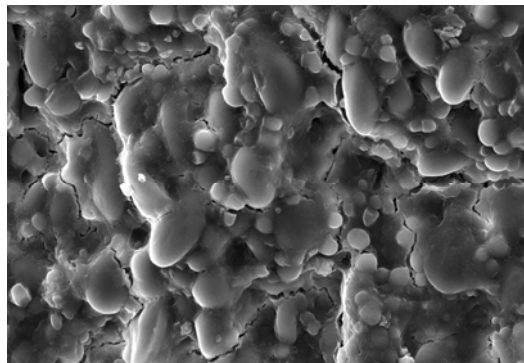
Figura 15. Micrografías de la modificación estructural de la masa fermentada con *Lb. plantarum*



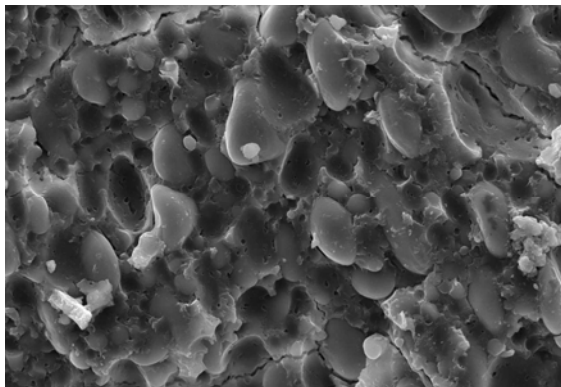
t=0



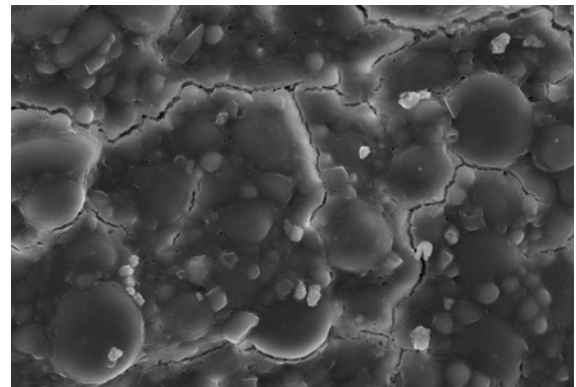
t=6h



t=12h

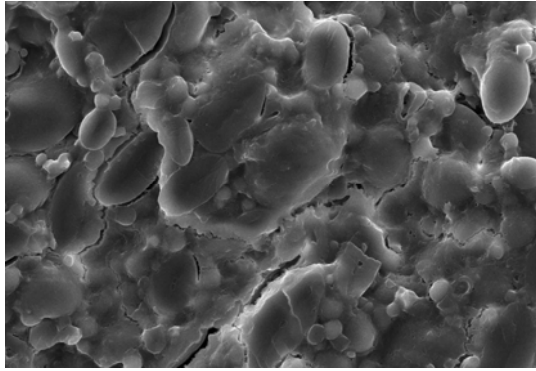


t=18h

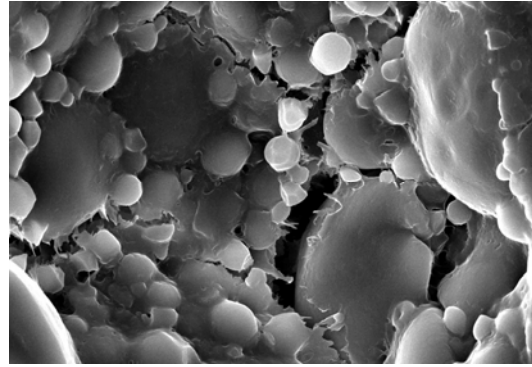


t=24h

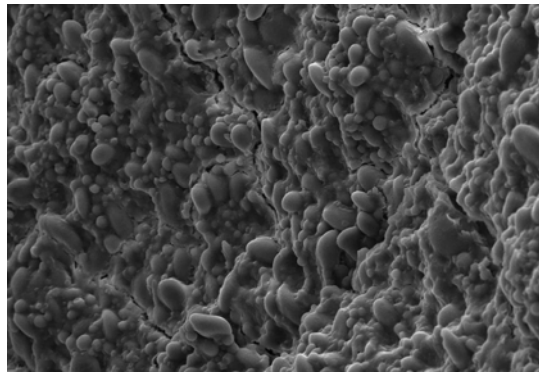
Figura 16. Micrografías de la modificación estructural de la masa fermentada con *Lb. sanfranciscensis*



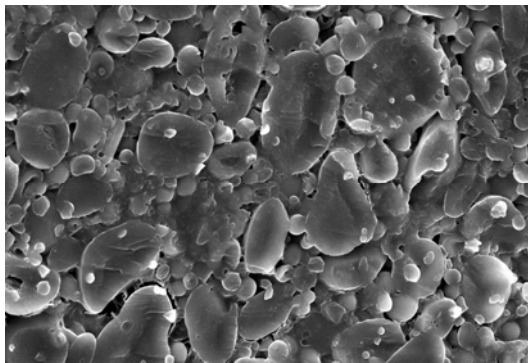
t=0



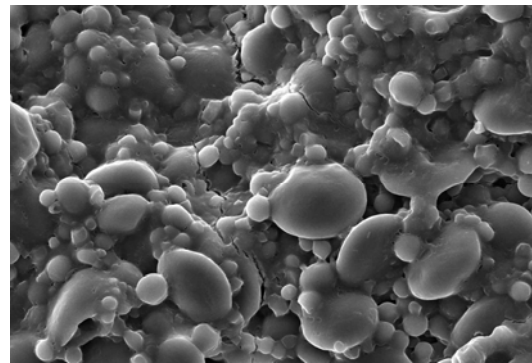
t=6h



t=12h



t=18h



t=24h

Figura 17. Micrografías de la modificación estructural de la masa fermentada con *Lb.brevis*

En las figuras 4-6, son evidentes los cambios microestructurales que ocurrieron a medida que la fermentación transcurría. Sin embargo, también es de notar que la microestructura de la masa es diferente en función del tipo de microorganismo utilizado. Así, pareciera que la mayor degradación de la matriz proteínica estuvo

dada a las 24 h de fermentación, siendo más intensiva cuando se utilizó *Lb. plantarum*, seguida de *Lb. brevis* y en menor intensidad para *Lb. sanfranciscensis*.

Thiele *et al.*, (2004) determinaron la hidrólisis y la depolimerización de las proteínas del gluten durante la fermentación en masas agrias. Informan que durante este proceso, ocurre una hidrólisis sustancial de la gliadina y glutenina donde intervienen las enzimas que están presentes naturalmente en la harina. Las BAL pueden exhibir también actividad proteolítica, pero sus actividades son específicas y pareciera ser que sólo juegan un papel menor en los eventos proteolíticos totales. Sin embargo, en el presente estudio, se pudo apreciar que dependiendo del tipo de bacteria ácido láctica empleada en la fermentación, la manera en cómo se afectó la estructura basada en las proteínas de la masa, fue diferente.

Lb. plantarum, que presentó la mayor tasa de acidificación, afectó considerablemente la microestructura de la masa, quizá promoviendo una mayor actividad enzimática de las proteasas desde las primeras horas de la fermentación, ya que a las 6 horas de proceso, la masa ya había alcanzado un valor de pH de 4.91, cercano al valor de actividad óptima de las enzimas de la harina (Bleux *et al.*, 1997). Menores actividades enzimáticas podrían esperarse en las masas de los otros microorganismos de prueba, pues a las 6 h de proceso el valor de pH alcanzado fue de 5.17 para *Lb. sanfranciscensis* y de 5.70 para *Lb. brevis* para los mismos tiempos de fermentación. No obstante a las 12 h de proceso, todas las masas habían alcanzado valores de pH de alrededor de 4, por lo que puede inferirse una alta actividad enzimática de las enzimas de la harina.

Thiele *et al.*, (2004) señalan que el crecimiento y el metabolismo de las BAL cesa cuando las masas han alcanzado valores de pH entre 3.6 y 3.8. También mencionan que la hidrólisis de las gluteninas, es principalmente dependiente del pH y que no se relaciona con las proteinasas específicas de las BAL. Si esto es así, para valores similares de pH en las masas no deberían encontrarse cambios en las propiedades reológicas de las masas para un mismo tipo de harina. Esto es, las masas fermentadas con *Lb. brevis* y con *Lb. sanfranciscensis*, que se comportan de manera similar en cuanto al progreso en la disminución del pH, tendrían una reología parecida.

No obstante, se ha informado que varias cepas de *Lb. plantarum* son ácido tolerantes, con capacidad para crecer a pH de 4 (Cebeci y Gürakan, 2003), lo que podría estar relacionado con la microestructura que presentaron las masas fermentadas 24 h, donde se observa una degradación mayor de la matriz proteínica (figura 4), en relación con las otras masas (figuras 5 y 6). La capacidad de tolerar condiciones ácidas, hace que este microorganismo sea considerado como un probiótico promisorio.

Gänzle *et al.*, (2008) mencionan que *Lb. sanfranciscensis* y muchas otras BAL de las masas agrias, no poseen actividad proteolítica extracelular y que es la actividad enzimática de las proteasas presentes en la harina de trigo la que da soporte al crecimiento de los lactobacilos no-proteolíticos. Esta bacteria transporta péptidos y la degradación a aminoácidos la realiza mediante peptidasas intracelulares. También señalan que por la acidificación por las BAL y la reducción de puentes disulfuro en las proteínas del gluten, aumenta la susceptibilidad a la proteólisis. La hidrólisis de péptidos (proteólisis secundaria) por las BAL acumula aminoácidos en la masa independientemente de la cepa utilizada en la fermentación. Mientras que la degradación proteínica debilita la masa. La fermentación con BAL afecta la distribución de tamaño de los péptidos resultantes de la degradación proteolítica disminuyendo la presencia de péptidos grandes e incrementando los niveles de moléculas más pequeñas tales como dipéptidos y aminoácidos (Zotta *et al.*, 2006).

Se ha señalado que los únicos cambios en las proteínas del gluten que pueden ser atribuidos a la presencia de las BAL en una masa agria, son la aparición de nuevos fragmentos proteínicos (20 y 27 kDa) a partir de las gliadinas y la degradación de subunidades de alto peso molecular de la glutenina (Zotta *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento viscoelástico de masas agrias en función de la composición del inóculo (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis* y *Lb. sanfranciscensis*). Debido a que al utilizar bacteria ácido lácticas para fermentar masas se puede degradar la proteína (gliadina) causante de la patología que sufren los enfermos celiacos. Sin embargo no existe información de los cambios reológicos que sufren las masas después de la fermentación.

Al evaluar el pH y acidez en masas fermentadas con lactobacilos, se observó que durante la fermentación el pH disminuye gradualmente en las masas, siendo *Lb. plantarum* el que tuvo un pH menor (3.75) seguido de *Lb. sanfranciscensis* (3.95) y *Lb. brevis* (4.07), en la masa control el pH se mantuvo en 4.0, lo anterior indica que las BAL tienen la capacidad de fermentar a pH inferior a 4 y generar acidez como ácido láctico de alrededor de 0.6-0.8%.

En la prueba de extensibilidad biaxial se observó que conforme aumenta el tiempo de fermentación las masas pierden su componente elástico, siendo a partir de las 6 h cuando las masas empiezan a tomar un comportamiento más viscoso. Por otro lado, en la prueba de extensibilidad uniaxial se observa que también se pierden características de extensibilidad así como fuerza necesaria requerida para la extensión, siendo la masa fermentada con *Lb. sanfranciscensis* la masa que pierde mayor extensibilidad a las 24 h (10.5%), mientras que la masa inoculada con *Lb. brevis* pierde solo 1.23% de extensibilidad después de 24h, sin embargo pierde más resistencia a la extensión 35.38% gf. El masas fermentadas con *Lb. plantarum*, la mezcla y el control presentan en mismos comportamiento, pierden extensibilidad y ganan resistencia a la extensión o viceversa..

Además, los cambios que se presentaron en las masas así como la pérdida de extensibilidad se debe a la actividad proteolítica que tienen lugar durante la fermentación de las masas por las bacteria ácido lácticas influyendo sobre la estructura del gluten y liberando aminoácidos responsables del sabor y el aroma. Esta pruebas son de gran importancia ya que debido a esto se puede predecir el comportamiento de la masa durante la panificación, ya que las propiedades

viscoelásticas de una masa, son las propiedades que proporciona un gluten hidratado en donde los gránulos de almidón actúan como relleno por lo que una masa necesita ser extensible para responder al incremento de la presión de las burbujas de gas durante la fermentación pero también debe tener la suficiente fuerza para que no se colapse durante la expansión

Por otro lado, fueron evidentes los cambios en la microestructura de las masas a medida que la fermentación transcurría. Sin embargo, también se observó que la microestructura de la masa es diferente en función del tipo de microorganismo utilizado. Así, pareciera que la mayor degradación de la matriz proteínica estuvo dada a las 24 h de fermentación, siendo más intensiva cuando se utilizó *Lb. plantarum*, seguida de *Lb. brevis* y en menor intensidad para *Lb. sanfranciscensis*. *Lb. plantarum*, que presentó la mayor tasa de acidificación, afectó considerablemente la microestructura de la masa, quizá promoviendo una mayor actividad enzimática de las proteasas desde las primeras horas de la fermentación.

La importancia de este trabajo radica en la poca existencia de productos libres de gluten, ya que en México cada vez aumenta el número de personas que son intolerantes al gluten, surgiendo la necesidad de buscar alternativas para la elaboración de productos elaborados a base de harina de trigo libres de gluten. Con este trabajo se puede inferir que las cepas utilizadas para la fermentación de masas de harina de trigo son capaces de degradar las proteínas modificando sus propiedades reológicas. Por lo que en estudios posteriores se recomienda analizar el grado de hidrólisis que sufre la proteína causante de la toxicidad a los enfermos celíacos así como su posible recuperación de propiedades viscoelásticas para la producción de productos de harina de trigo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Corsetti, A., Settanni, L., Valmorri, S., Mastrangelo, M. And Suzzi, G. (2007). Identification of subdominant lactic acid bacteria and their evolution during laboratory-scale fermentations. *Food Microbiology*. 24:592-600.
2. Datta, A.K., Sahin, Sahin, S., Sumnu, G., Ozge, S.K. (2007). Porous media characterization of breads baked using novel heating modes. *Journal of Food Engineering* 79:106-116.
3. De angelis, M, Di Cagno, R., Gallo, G. Curci, M., Siragusa, S. Crecchio, C. Parente, E. y gobbetti, M. (2007).Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*. 114:69:82
4. De Angelis, M., Coda, R., Silano, M., Minervini, F., Rizzello, C.G., Di Cagno R., Vicentini, O., De Vicenzi, M. y Gobbetti, M. (2006). Fermentation by selected sourdough lactic acid bacteria to decrease coeliac intolerance to rye flour. *Journal of cereal Science* 43: 301-314.
5. De Angelis, M., Rizzello, C.G., Fasano, A., Clemente, M.G., Simone, C de., Silano, M., Vincenzi, M de. Losito, I., y Gobbetti, M. (2005). VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue probiotics and gluten intolerant. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1762(1):80-93.
6. De Vuyst, L. y Vancanneyt, M. (2007). Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology*. 24:120-127.
7. Decock, P. and Cappelle, S. (2005). Bread technology and sourdough technology. *Trends in Food Science & Technology*. 16: 113-120.
8. Dendy, D.A. y Dobraszczyk, B.J. (2001). *Cereales y Productos derivados*. Editorial Acribia, S.A.
9. Der Borgh, A.V., Goesart, H., Veraverbeke, W.S. y Delcour, J.A. (2005). Review. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and factors involved. *Journal of Cereal Science*. 41:221-237.
10. Di Cagno, R., Angelis, M de., Auricchio, S., Greco, L., Clarke, C., Vicenzi, M de., Giovannini, C., D'Archivio, M., Landolfo, F., Parrilli, G., Minervini, F., Arendt, E. y Gobbetti, M. (2004). Sourdough Bread Made from Wheat and Nontoxic Flours and Started with Selected *Lactobacilli* Is Tolerated in Celiac Sprue Patients. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(2):1088-1096.
11. Di Cagno, R., De Angelis, M., Alfonsi, G., Vincenzi, M de., Silano, M., Vicentini, O., y Gobbetti, M. (2005). Pasta Made from Durum Wheat Semolina Fermented with Selected *Lactobacilli* as a Tool for a Potential Decrease of

The Gluten Intolerance. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53, 4393-4402.

12. Di Cagno, R., De Angelis, M., Lavermicocca, P., De Vicenzi, M., Faccia, M. Y Gobetti, M. (2002). Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: Effects on wheat Flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. Applied and Environmental Microbiology. 68:623-633.
13. Dobraszczyk, B.J. y Morgenstern, M.P. (2003). Rheology and the breadmaking process. Journal of Cereal Science. 38:229-245
14. Eliasson, A.C. y Larsson, K. (1993). Cereals in Breadmaking. A molecular Colloidal Approach. Food Science and Technology. University of Lund, Sweden. Marcel Dekker, Inc.
15. Estela, W., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillaza, E. y Egoavil, E. (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. Rev. peru. biol. 14(2): 271-275 .
16. Gaceta parlamentaria, 2005.
<http://www.senado.gob.mx/sen60/sgsp/gaceta/?sesion=2005/02/22/1&cocumeto=13>
17. Ganzle, G.M., Loonen, J. y Gobetti, M. (2008). Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. Trends in Food Science & Technology. 1-10. Article in Press.
18. Gobetti, M., Rizzello, C.G., Cagno, R. di. y Angelis, M. de. (2007). Sourdough lactobacilli and celiac disease. Food Microbiology. 24(2): 3rd International Symposium on Sourdough, 187-196.
19. Gobetti, M., De Angelis, M., Corsetti, Di Cagno, R. (2005). Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. Trends in Food Science & Technology. 16: 57-69.
20. Holtmeier, W., y Caspary, W.F. (2006). Review .Celiac Disease. Review. Orphanet Journal Of Rare Diseases. 1:3
21. Katina, K. (2005). Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread. VTT Biotechnology. Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki. Tesis Doctoral.
22. Katina, K., Arendt, E., Liukkonen, K.H., Autio, K., Flander, L. And Poutanen (2005). Potential of sourdough for healthier cereal products. Trends in Food Science & Technology. 16: 104-112.
23. León, P.A., Montoya, C.O., Motato, K.E., Granda, D.M., Acaro, C.A., Restrepo, J.M., Echeverri, S., Valencia, J., y Quinchía, L. (2006). Bacterias ácido lácticas (BAL) silvestres colombianas presentan propiedades

24. Loponen, J., Sontag-Strohm, T., Venalainen, J., y Salovaara, H. (2007). Prolamin hydrolysis in wheat sourdoughs with differing proteolytic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(3):978-984.
25. Manifiesto Celiaco, 2007. <http://celiacomex.wordpress.com/2007/04/>
26. Neysens, P. y De Vuyst, L. (2005). Kinetics and modelling of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology* 16:95:103.
27. Peña, E., Bernardo, A., Soler, C. y Jouve, N.(2005). Relationship between common (*Triticum aestivum* L.)gluten proteins and doughj rheological properties. *Euphytica*. 143:169:177.
28. Rizzello, C.G., Angelis, M de., Cagno, R. di., Camarca, A., Silano, M., Losito, I., De Vincenzi, M., De Bari, M.D., Palmisano, F., Maurano, F., Gianfrani, C., y Gobbetti, M. (2007). Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectivas for celiac disease. *Applied and Environmental Microbiology*.
29. Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D. (2000). *Encyclopedia of food microbiology*. Academic Press. Volume Two. P.p. 1144-1151.
30. Salim-ur- Rehman, Paterson, A., Piggott, J.R. (2006). Flavour in sourdough breads: a review. *Trends in Food Science and Technology*. 17:557-566.
31. Savijoki, K., Ingmer, H. and Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Mini-Review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 71:394-406.
32. Sneath, H.A.P., Mair, S.N., Sharpe, M.E. y Holt, G.J.(1986). *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Volume Two. Editorial Board. pp.1209-1233.
33. Sourdoughs international, 2007. <http://www.sourdo.com/recipies.html>
34. Torbica, A., Antov, M., Mastilovic, J. y Knezevic, D.(2007). The influence of changes in gluten complex on technological quality of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Food Research International* 40: 1038-1045.
35. Wieser, H. (2007). Chemistry of Gluten proteins. *Food Microbiology*. 24: 115-119.
36. Neubauer, H., Glaesker, E. Hammes, W.P., Poolman, B. y Konings, W.N. (1994). Mechanism of Maltose Uptake and Glucose Excretion in *Lactobacillus sanfrancisco*. *Journal of Bacteriology*. p. 3007-3012.
37. Rönkä, E., Malinen, E. Saarela, M. Rinta-Koski, M., Aarnikunnas, J., Palva, A.(2003). Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *International Journal of Food Microbiology* 83 (2003) 63– 74.

38. Cebeci, A. y Gürakan, C. (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology* 20: 511–518
39. Paramithiotis, S., Chouliaras, Y. Tsakalidou, E. and Kalantzopoulos, G. (2005). Application of selected cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. *Process Biochemistry*. 40:2813-2819.
40. Veraverbeke, W.S. y Delcour, J.A. (2002). Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *Critical Reviews in Food (Veraverbeke y Delcour, 2002). Science and Nutrition*. 42(3): 179-208.
41. Robles-Sosa, S.D., Bautista-Peña, R.J. y Fuentes-Dávila, G. (2005). Efecto de la Molienda de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) y trigo duro (*Triticum durum* Desf.) sobre la germinación de teliospora *Tilletia indica* Mitra. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23:119-123.