

UTILIZACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS TERMOTOLERANTES PROBIÓTICAS EN LA FERMENTACIÓN DE MASAS ÁCIDAS PARA PANIFICACIÓN

N. Saucedo-Briviesca^a, A.M. Hernández-Alcántara^b, L.C. Vázquez-Chávez^b, M.L. Pérez-Chabela^{b*}

^a Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. Av. Universidad 3000, Colonia del Carmen, Delegación Coyoacán. C.P. 04510, Ciudad de México, México. ^b Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa. C.P.09340, Ciudad de México, México. *lpch@xanum.uam.mx

RESUMEN:

La fermentación espontánea de masas madre es la forma más antigua de producir pan, siendo esta técnica poco estandarizada como para ser escalada industrialmente y obtener mediante esta vía productos de la misma calidad. Como alternativa a este proceso, se ha buscado el uso de un cultivo iniciador para tener una fermentación constante y eficiente, así como disminuir el uso de aditivos y coadyuvantes. En este estudio se utilizaron dos cepas de bacterias lácticas termotolerantes probióticas: *P. pentosaceus* UAM5 y *E. faecium* UAM1; así como *L. plantarum* 8014 como control en la elaboración de masas ácidas para panificación, se determinaron parámetros fisicoquímicos como pH, acidez y aumento de volumen durante la fermentación. Los resultados demostraron que la cepa *P. pentosaceus* UAM5 acidifica las masas más rápido que *L. plantarum* 8014, mientras que *E. faecium* UAM1 lo hace más lento. Al presentarse un buen crecimiento por parte de las dos cepas evaluadas, se puede sugerir su uso como cultivos iniciadores en la fermentación de masas ácidas para panificación.

ABSTRACT:

The spontaneous fermentation of sourdough is the oldest way of producing bread, however it is not a standardized technique to be scaling at industrial level and get through these way products of the same quality. As an alternative to this process, it has been proposed the use of starter cultures in order to have an efficient and constant fermentation process as well as reducing the amount of additives and coadjutant during bread production. In this study, two thermotolerant and probiotic strains of lactic acid bacteria (*P. pentosaceus* UAM5 and *E. faecium* UAM1) and a reference strain of *L. plantarum* 8014 were used during the preparation of bakery sourdough to determine some physico-chemical parameters such as pH, acidity and volume increase during fermentation process. The results demonstrated that *P. pentosaceus* UAM5 acidified the dough faster than *L. plantarum* 8014, while *E. faecium* UAM1 does it slower. As both lactic acid strains studied showed a good growth, it can be suggested their use as starter cultures in the fermentation of acidic masses for breadmaking.

Palabras clave: bacterias lácticas, fermentación, masa ácida

Keywords: lactic acid bacteria, fermentation, sourdough.

Área: Microbiología y biotecnología.

INTRODUCCIÓN

El empleo de masas ácidas, es uno de los procesos biotecnológicos más antiguos en la elaboración de alimentos derivados de cereales, siendo una vía para mejorar las características del producto final. Las masas ácidas son obtenidas a partir de un cultivo iniciador, el cual es una preparación de células microbianas, que se añade a

una materia prima para producir un alimento fermentado (Leroy y De Vuyst, 2004). Los principales microorganismos empleados como cultivos iniciadores son las bacterias ácido lácticas (BAL). El uso de cultivos iniciadores ejerce un impacto en la calidad final de los alimentos fermentados. La fermentación con cultivos bien caracterizados de levaduras o bacterias ácido lácticas (BAL), podría ser una herramienta potencial para mejorar; características sensoriales, el procesos de elaboración y el valor nutritivo de los productos fermentados a base de cereales o ingredientes ricos en fibra, como en el caso del pan de masa fermentada (Salmenkallio y col., 2001). Los parámetros tecnológicos de importancia en una fermentación son: la tasa de crecimiento y de acidificación (Coda y col., 2010), la síntesis de compuestos antimicrobianos (Messens y De Vuyst, 2002), la actividad antifúngica (Coda y col., 2013) y la producción de exopolisacáridos (Galle y Arendt, 2014).

Estudios recientes, han demostrado que el uso de BAL durante la fermentación de masas madre tiene un enfoque biotecnológico al permitir explotar el potencial de cereales y pseudocereales durante la fabricación de pan (Coda y col., 2010). Debido a que la calidad de los alimentos obtenidos a través de la fermentación espontánea no es predecible, el uso de cultivos iniciadores resulta ser una herramienta conveniente para estandarizar el proceso de fermentación y tener una mejor calidad en el producto final. Por lo anterior, los objetivos de este trabajo fueron evaluar el crecimiento y la tasa de acidificación de dos bacterias lácticas termotolerantes probióticas, *P.pentosaceus* UAM5 y *E.faecium* UAM1, en masas para panificación, comparando dicho comportamiento con una bacteria característica de masa ácida, *L.plantarum*. Nuestros resultados mostraron que la cepa *P. pentosaceus* UAM5 acidifica más rápido que *L. plantarum* 8014, mientras que *E. faecium* UAM1 lo hace más lento. Además se demostró que no se ve afectada la disminución del pH durante la fermentación con la adición de levadura a la masa con bacterias lácticas. En general las dos cepas de bacterias lácticas probióticas termotolerantes cumplen la función de acidificar la masa, por lo que se sugiere su uso como cultivos iniciadores en la fermentación de masas para panificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto se dividió en dos etapas: en la primera, las cepas fueron reactivadas e inoculadas (en diferentes porcentajes) en masas sin levadura, llevándose a cabo la fermentación hasta alcanzar un valor de pH de 4.5. En la segunda etapa se realizaron las fermentaciones en presencia de levadura para establecer si existía un efecto de ésta sobre las bacterias lácticas.

Reactivación de cepas y pruebas bioquímicas

Se utilizaron dos cepas de bacterias lácticas termotolerantes probióticas (*Enterococcus faecium* UAM1 y *Pediococcus pentosaceus* UAM5) y una cepa de colección del cepario de la Facultad de Química de la UNAM (*Lactobacillus plantarum* 8014), siendo esta última una bacteria típica de la fermentación espontánea de masas ácidas (De Vuyst y col., 2014). Las tres cepas fueron reactivadas en caldo MRS (De Man y col., 1960) a 35°C durante 24 horas. Se realizaron algunas pruebas bioquímicas para comprobar la pureza de las cepas:

tinción de Gram para corroborar la morfología, catalasa, oxidasa, crecimiento en presencia de 6.5% de NaCl, crecimiento a 25 y 45°C, acidificación y coagulación en medio Litmus Milk a 45°C (Harrigan y MacCance, 1993)

Determinación del porcentaje de inóculo

A partir de un pre-inóculo de 19 h de las bacterias ácido lácticas se inóculo con el 2% (v/v) un matraz conteniendo 200 mL de caldo MRS, incubándose a 35°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 1.0 (correspondiente a 10^9 UFC/mL). Se prepararon masas de 100 g de harina de trigo refinada “Tres Estrellas”, variando la cantidad de inóculo incorporado para llevar a cabo la fermentación (0, 15, 30, 45 y 60%) Las masas fueron incubadas a 30°C, determinando cada 2 h el valor de pH y acidez expresada como porcentaje de ácido láctico (AOAC, 1980), a cada una de las masas, desde el $t=0$ y hasta alcanzar un pH de 4.5 o cercano a él.

Elaboración de masas con bacterias lácticas y levadura

Se prepararon masas considerando el porcentaje de inóculo de BAL con mejores resultados, adicionando la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, “La Florida”, al 1.5%, monitoreando nuevamente el pH desde tiempo cero hasta un valor de 4.5 o cercano, y realizando cuenta en placa a partir de las 2 h de fermentación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se comprobó la pureza de las cepas utilizadas (*P.pentosaceus*, *E.faecium* y *L.plantarum*), observando el aspecto de las colonias en agar MRS y la morfología al microscopio mediante una tinción de Gram. Las tres cepas de BAL fueron Gram positivas, catalasa y oxidasa negativas, lo que indica que ninguna produce dicha enzima y no poseen citocromos. En los tubos con caldo MRS y NaCl al 6.5% se observó crecimiento para las tres cepas, lo cual indica que presentan tolerancia a esta concentración de sal. El crecimiento en medio Litmus Milk se monitoreo durante 2 días, observándose múltiples reacciones metabólicas: las tres cepas fueron capaces de acidificar el medio, indicando la fermentación efectiva de la lactosa (Mac Faddin, 1990), sin la coagulación de la caseína ni producción de CO_2 . Por otra parte; se obtuvo crecimiento de las tres cepas a 45 y 25°C.

En la tabla I se muestran los valores de pH y acidez (expresada como porcentaje de ácido láctico) que se tuvieron al final de la fermentación con las concentraciones de inóculo empleadas de las tres cepas en estudio. Se puede destacar que las masas con bacterias lácticas presentan una disminución notable del pH y un aumento en la acidez, en comparación con la masa testigo (0% de inóculo), esto debido a la producción de ácido láctico por parte de la cepa que está fermentando la masa, el principal producto de la fermentación de hexosas en bacterias lácticas homofermentativas (Gänzle y col., 2007). Es posible apreciar que mientras mayor fue la cantidad de inóculo adicionado, la velocidad de acidificación de la masa fue mayor, lo cual era lo esperado.

La cepa que acidifica más y en el menor tiempo es *P. pentosaceus* UAM5, seguida de *L. plantarum* y finalmente *E. faecium* UAM1. Se puede destacar que *L. plantarum* 8014 tiene una buena producción de ácido láctico aunque esta no repercute de

manera significativa en la disminución del pH. Este resultado, indica que *P. pentosaceus* UAM5 tiene una mejor adaptación al medio en el que se encuentra y que su metabolismo de producción de ácido láctico se vio acelerado. En general, las tres cepas fueron capaces de adaptarse al medio (masa para pan) y producir ácido láctico como principal producto de la fermentación, debido a su carácter homofermentativo.

Tabla I. Valores de pH y acidez (expresada como % de ácido láctico) al final de la fermentación de las masas con diferentes porcentajes de inóculo.

Con <i>Pediococcus pentosaceus</i> UAM5.										
Tiempo (horas)	0% inóculo		15% inóculo		30% inóculo		45% inóculo		60% inóculo	
	pH	Acidez	pH	Acidez	pH	Acidez	pH	Acidez	pH	Acidez
6	6.1	0.089	4.71	0.341	4.5	0.449	4.42	0.677	4.39	0.773
Con <i>Enterococcus faecium</i> UAM1.										
8	6.04	0.089	4.98	0.317	4.97	0.461	4.88	0.437	4.61	0.545
Con <i>Lactobacillus plantarum</i> 8014.										
8	6.04	0.089	4.74	0.437	4.52	0.473	4.48	0.509	4.45	0.581

Al analizar las cinéticas de fermentación de las masas con las diferentes BAL y porcentajes de inóculo adicionado, se eligieron sólo dos cantidades de inóculo; 30 y 45% para llevar a cabo la segunda fase del proyecto, con los cuales fue posible obtener un valor de pH de aproximadamente 4.5 a las 6 u 8 horas de fermentación, siendo este pH el óptimo para la elaboración de una masa madre ácida (Fretzdorff y Brummer, 1992). Las nuevas condiciones seleccionadas permitieron la elaboración de masas con levadura, a partir de las cuales fue posible determinar el pH, la altura de la masa y la cuenta celular durante el proceso de fermentación.

En la tabla II se presentan los resultados de la cuenta de bacterias lácticas durante la fermentación de cada masa a las diferentes concentraciones de inóculo. Se obtuvieron cuentas bacterianas mayores a 10^8 UFC/g de masa al finalizar la fermentación de las mismas. Estos datos permitieron corroborar que las bacterias lácticas presentan un crecimiento óptimo en la masa y que dependiendo del porcentaje de inóculo adicionado, se obtienen cuentas celulares mayores a 10^8 UFC/g, teniendo una diferencia de aproximadamente un ciclo logarítmico entre cada porcentaje utilizado.

Tabla II. Cuenta de bacterias lácticas durante la fermentación de las masas.

Tiempo (h)	<i>P. pentosaceus</i> UAM5		<i>E. faecium</i> UAM1		<i>L. plantarum</i> 8014	
	30%	45%	30%	45%	30%	45%
	log UFC/g	log UFC/g	log UFC/g	log UFC/g	log UFC/g	log UFC/g
2	6.30	7.48	6.00	7.30	6.48	8.00

4	6.48	8.00	8.30	8.30	8.00	9.30
6	8.48	9.30	8.30	8.48	10.00	10.48

Por otro parte, se determinó que la adición de levadura a las masas con bacterias lácticas no repercute en la disminución del pH, lo cual es razonable, dado que *Saccharomyces cerevisiae* lleva a cabo una fermentación alcohólica, donde se genera etanol y CO₂ como principales productos (Pretorius, 2000), por lo que cual no aporta acidez al medio. Se realizaron mediciones de aumento de volumen de las masas combinadas con levadura y se demostró que esta combinación no repercute en el crecimiento o hinchamiento de la masa. Se observó que únicamente en las primeras 2 horas se tiene un incremento de volumen en la masa, lo que evidencia que la levadura tiene su mayor producción de CO₂ al inicio de la fermentación, y que además puede estar afectada por la disminución del pH en las masas debido a la producción de ácido láctico por parte de las bacterias ácido lácticas.

A pesar de que *L. plantarum* es una cepa muy característica en la fermentación de masas ácidas en comparación con las bacterias lácticas estudiadas, se encontró que la cepa *P. pentosaceus* UAM5 acidifica más rápido que *L. plantarum* 8014, mientras que *E. faecium* UAM1 lo hace más lento. No obstante, se puede destacar el papel de ambas bacterias acidificando la masa, lo que se sugiere su uso como cultivos iniciadores en la fermentación de masas para panificación podría ser potencialmente aplicable.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC, (1980). Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis, 16th, Chapter 33, pp 10.
- Coda, R., Nionelli, L., Rizzello, C. G., De Angelis, M., Tossut, P., & Gobbetti, M., 2010. Spelt and emmer flours: characterization of the lactic acid bacteria microbiota and selection of mixed autochthonous starters for bread making. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 925-935.
- Coda, R., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., Trani, A., Cardinali, G., & Gobbetti, M., 2013. Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread. *Food Microbiology*, 33: 243-251.
- De Man, J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M. E., 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1): 130-135.
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.M., Weckx, S., 2014. Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform?. *Food Microbiology*. 37:11-29.
- Fretzdorff, B., & Brümmer, J.-M., 1992. Reduction of phytic acid during breadmaking of wholemeal breads. *Cereal Chemistry*, 69: 266–270.
- Galle, S., & Arendt, E. K., 2014. Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54: 891-901.
- Gänzle M.G., Vermeulen N. & Vogel R. F., 2007. "Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough". *Food Microbiology*, 24(2): 128-138.

- Harrigan, W.F. and McCance, M.E., 1993. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, London.
- Leroy, F., De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food industry. Trends in Food Science & Technology, 74: 67– 78.
- Mac Faddin, JF., 1990. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Panamericana. Argentina, 1-111.
- Messens, W., & De Vuyst, L. (2002). Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs - a review. International Journal of Food Microbiology, 72: 31-43.
- Pretorius, IS., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast, 691: 675–729.
- Salmenkallio-Marttila, M., Katina, K., & Autio, K., 2001. Effect of bran fermentation on quality and microstructure of high-fibre wheat bread. Cereal Chemistry, 78: 429-435.