

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA

ESCUELA DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, ALIMENTOS Y AMBIENTAL



Evaluación de las propiedades antifúngicas de compuestos bioactivos
provenientes de masas madre fermentadas tipo *poolish* y su utilización como
conservadores en hogazas de pan

Tesis presentada en cumplimiento parcial de los requisitos para obtener el
grado de Doctor en Ciencia de Alimentos

Ricardo Hilario Hernández Figueroa

Asesor:

Dr. Aurelio López-Malo Vigil

Co-asesor:

Dra. Emma Mani López

Santa Catarina Mártir, Cholula Puebla

Carta de validación del Comité Tutorial

UDLAP

ACTA DE REVISIÓN Y AUTORIZACIÓN DE TESIS

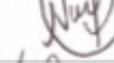
ESCUELA DE INGENIERÍA
Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental
Doctorado en Ciencia de Alimentos

Nombre del estudiante: Ricardo Hilario Hernández Figueroa

ID: 124882

Nombre del director de tesis: Dr. Aurelio López-Malo Vigil

Título de la tesis: Evaluación de las propiedades antifúngicas de compuestos bioactivos provenientes de masas madre fermentadas tipo *poolish* y su utilización como conservadores en hogazas de pan.

Integrantes del Comité Doctoral	Firma
Dra. Emma Mani López	
Dra. Nelly Ramírez Corona	
Dr. Jocksan Ismael Morales Camacho	
Dr. Gabriel Abraham Cardoso Ugarte	
Dr. Aurelio López Malo Vigil	

Los integrantes del Comité Doctoral expresamos que hemos leído y revisado el manuscrito de la tesis de Doctorado en Ciencia de Alimentos anteriormente descrita, por lo que estamos de acuerdo en que se proceda a generar la versión definitiva de la tesis y programar el examen de grado en la fecha, horario y lugar que se indican a continuación.

Fecha y hora de examen: 14 de mayo de 2024, 9:00 am.

Lugar: HU 314, UDLAP.

Agradecimientos

Agradezco a mis asesores Dr. Aurelio López-Malo y Dra. Emma Mani López, por todo el apoyo dado para la realización de esta investigación. Quiero también darle las gracias por todos los conocimientos que me otorgaron durante mi tiempo en la universidad durante el estudio del doctorado y de todos los años colaborando en distintos proyectos.

Agradezco a todos los profesores del departamento de Ingeniería de Alimentos, por haberme otorgado sus conocimientos.

Agradezco a la Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) y a la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP) por las becas otorgadas para la realización y estudio del doctorado.

Agradezco a Alma Fátima Aguilar Gallegos por ser mi compañera de vida, por confiar en mí y siempre motivarme a seguir adelante. Este logro será siempre compartido.

Índice

Carta de validación del Comité Tutorial	2
Agradecimientos	3
Índice de Tablas	8
Índice de Figuras	10
Esquema de la tesis	13
Resumen	15
Abstract	17
1.Introducción	19
2 . Objetivos	21
2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Artículos de investigación.....	22
3.1 Masa madre tipo poolish con capacidad antifúngica suplementada con <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> y sus extractos acuosos in vitro y pan	22
<i>Resumen</i>	22
3.1.1 Introducción	22
3.1.2 Materiales y Métodos	24
3.1.2.1 Condiciones de cultivo y preparación de extracto acuoso.	24
3.1.2.2 Determinación de pH, acidez titulable y azúcares reductores de extractos acuosos (EA)	25
3.1.2.3 Inhibición de moho en medios líquidos	25
3.1.2.4 Inhibición del crecimiento radial de moho	26
3.1.2.5 Análisis de ácidos láctico y acético en extractos acuosos.....	27

3.1.2.6 Procedimiento de panificación	27
3.1.2.7 Determinación del pH, humedad y a_w del pan	28
3.1.2.8 Actividad antifúngica en el pan.	28
3.1.2.9 Análisis estadístico.....	28
3.1.3 Resultado y discusión	28
3.1.3.1 pH acidez titulable y azúcares reductores de los EA.....	28
3.1.3.2 Actividad antifúngica por DO_{630nm} y recuentos microbianos.....	30
3.1.3.3 Inhibición del crecimiento radial de moho.....	35
3.1.3.4 Cuantificación de ácidos láctico y acético en extractos acuosos.	39
3.1.3.5 Actividad antifúngica de masa madre tipo poolish fermentada con <i>L. plantarum</i> en pan.....	42
3.1.3.6 pH del pan, contenido de humedad y a_w durante el almacenamiento	43
3.1.4 Conclusión	46
3.1.5 Referencias	46
3.2 Actividad antifúngica de masa madre (Tipo II) de harina de trigo de dos <i>Lactobacillus</i> diferentes <i>in vitro</i> y pan	51
Resumen.....	51
3.2.1 Introducción	51
3.2.2 Materiales y métodos.....	53
3.2.2.1 Condiciones de cultivo	53
3.2.2.2 Preparación de extracto acuoso para caracterización fisicoquímica	54
3.2.2.3 Determinación de pH, acidez titulable, azúcares reductores y ácidos orgánicos	54
3.2.2.4 Modelado matemático del crecimiento radial del moho	55
3.2.2.5 Preparación de pan	55

3.2.2.6	Determinación de propiedades fisicoquímicas y de calidad del pan.....	56
3.2.2.7	Actividad antifúngica en el pan	57
3.2.2.8	Análisis estadístico.....	57
3.2.3	Resultados y discusiones	57
3.2.3.1	pH, acidez titulable y cuantificación de ácidos orgánicos.....	57
3.2.3.2	Inhibición del crecimiento radial	58
3.2.3.3	Propiedades fisicoquímicas y de calidad del pan	64
3.2.3.3	Análisis sensorial	71
3.2.3.4	Actividad antifúngica de masa madre tipo poolish fermentada con <i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-4495 o <i>Lactobacillus casei</i> 21/1	73
3.2.4	Conclusiones	77
3.2.5	Referencias	78
3.3	Evaluación de la actividad antifúngica de extractos acuosos y fracciones proteicas de masa madre fermentada por <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	84
3.3.1	Introducción	84
3.3.2	Materiales y métodos.....	86
3.3.2.2	Preparación de extractos acuosos.....	86
3.3.2.4	Fracciones de proteínas, ensayo de proteínas y electroforesis (SDS-PAGE)	88
3.3.3	Resultados y discusiones	91
3.3.4	Conclusión	103
3.3.5	Referencias	103
4.	Conclusiones y recomendaciones	108
5.	Evidencias de productos.....	110

Índice de Tablas

Tabla 1. pH, acidez titulable y azúcares reductores para diferentes masas fermentadas con <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> NRRL B-4496	29
Tabla 2. Parámetros (μ tasa de crecimiento máxima; λ fase de retraso) de la ecuación de Gompertz modificada que describe el crecimiento de los mohos tratados a diferentes concentraciones de los extractos acuosos pasteurizados de masa madre tipo poolish fermentada con <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> NRRL B-4496.....	37
Tabla 3. Concentraciones de ácido láctico y acético en los extractos acuosos de masa madre (PD) tipo poolish fermentada con <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> NRRL B-4496 a las 24, 48 o 72 h.	40
Tabla 4. Crecimiento de moho en pan control y pan adicionado con masa madre fermentada tipo poolish con <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> NRRL B-4496.....	42
Tabla 5. pH, acidez titulable y ácidos orgánicos de los extractos acuosos de diferentes masas madre fermentadas tipo poolish con <i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-4495 o <i>Lactobacillus casei</i> 21/1.....	60
Tabla 6. Tasa de crecimiento radial de <i>Penicillium chrysogenum</i> y <i>Penicillium corylophilum</i> en el extracto de masa madre poolish (pasteurizado) analizado.	63
Tabla 7. Volumen específico y relación ancho/alto de los diferentes panes analizados.	65
Tabla 8. pH de diferentes panes y masas analizadas al inicio y al final del almacenamiento	67
Tabla 9. Puntajes de la evaluación sensorial de las hogazas de pan (jueces no entrenados)	72

Tabla 10. Puntajes del análisis sensorial de las hogazas de pan evaluadas realizado con jueces semientrenados.	73
Tabla 11. Tiempo de falla (crecimiento visible de moho) de los diferentes panes analizados.	74
Tabla 12. Composición fisicoquímica de los extractos acuosos de masa madre suplementada con <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> NRRL B-4496.....	91
Tabla 13. Contenido de proteína para cada fracción proteica de extractos acuosos de masa madre fermentada con <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> NRRL B-4496.....	92
Tabla 14. Porcentaje de inhibición de los mohos a partir de extracto acuoso de masa madre (PP) tipo poolish pasteurizado nativo, PP neutralizado (PP-N) y PP neutralizado e hidrolizado con proteinasa K (PP-NH)	95
Tabla 15. Actividad antifúngica (mm) de los extractos acuosos (EA) de masa madre fermentada con <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> NRRL-B 4496 y sus fracciones proteicas	99

Índice de Figuras

- Figura 1. Porcentaje de inhibición (recuentos en placa) de extractos acuosos (EA) obtenidos de la masa tipo poolish (PD) fermentada con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 a las 24, 48 y 72 h en tres concentraciones y propionato de calcio (CP). Las distintas letras mayúsculas muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al tiempo de fermentación. Las letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la concentración de EAs en un mismo tiempo de fermentación..... 32
- Figura 2. Efecto de diferentes concentraciones de extractos acuosos de masa madre tipo poolish fermentada con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 a las 48 h y propionato de calcio (CP) sobre el crecimiento de mohos por densidad óptica a 630 nm..... 33
- Figura 3. Porcentaje de inhibición (recuentos en placa) de extractos acuosos (EA) nativos (PD48) o neutralizados (PD48N) obtenidos de la masa madre fermentada con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 después de 48 h en tres concentraciones. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a los EA nativos o neutralizados 34
- Figura 4. Efecto de las diferentes concentraciones de extractos acuosos (EA) pasteurizados de masa madre tipo poolish fermentada con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 durante 48 h sobre el crecimiento de los mohos probados. Agar papa dextrosa (PDA) control (■), PDA + 20% EA (●), PDA + 26% EA (*), PDA + 33% EA (▲), PDA + 50% EA (•) y líneas son los valores predichos utilizando la ecuación de Gompertz modificada..... 38
- Figura 5. Crecimiento radial de mohos tratados con diferentes niveles de extractos acuosos pasteurizados de masa madre tipo poolish fermentada (48 h) con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 (20, 26, 33 o 50%) o propionato de calcio (PCa al 0.3%) después de de 72 y 192 h de incubación a 25°C. (a) *Aspergillus niger*, (b) *Penicillium chrysogenum* y (c) *Penicillium corylophilum*..... 41

Figura 6. Crecimiento de hongos en los panes de control y en el pan suplementado con masa madre fermentada con *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 durante 48 h (BPD48h) durante el almacenamiento a 25 °C. 44

Figura 7. Actividad de humedad y agua (a_w) de la corteza y la miga de pan durante 14 días de almacenamiento a 25 °C. Corteza del control (-●-); miga del control (-▲-); corteza BPD48h (-*-); miga BPD48h (-■-). BPD48h es pan al que se le añade masa madre fermentada con *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 durante 48 h 45

Figura 8. Crecimiento de los mohos y predicción con la ecuación de Gompertz modificada a partir de extractos de masa madre acuosa pasteurizada tipo poolish suplementados al 50%. PPA: extracto acuoso de masa madre tipo poolish pasteurizado suplementado con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495; PPC extracto acuoso pasteurizado de masa madre tipo poolish suplementado con *Lactobacillus casei* 21/1. 62

Figura 9. Rebanadas de pan formuladas con distintos ácidos o masas madre tipo poolish. Control: pan elaborado con la formulación básica. Control LA: pan adicionado con ácido láctico. Pan control LA-AA adicionado con ácido láctico y acético. BPA: pan suplementado con masa madre tipo poolish con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, y BPC: pan adicionado con masa madre tipo poolish con *Lactobacillus casei* 21/1. 66

Figura 10. . Contenido de humedad y actividad agua (a_w) de la corteza y miga de los panes en el momento 0 de almacenamiento (inicial) y al final del almacenamiento (final). Control: pan elaborado con la formulación básica. Control LA: pan adicionado con ácido láctico. Pan control LA-AA adicionado con ácido láctico y acético. BPA: pan suplementado con masa madre tipo poolish con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, y BPC: pan adicionado con masa madre tipo poolish con *Lactobacillus casei* 21/1. Diferentes letras mayúsculas muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) en cuanto al tipo de pan. Letras minúsculas diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar los valores de tiempo de almacenamiento inicial y final. 70

Figura 11. Crecimiento de hongos en las hogazas de pan control, panes adicionados con ácido láctico (control LA), panes adicionados con ácido láctico y acético (control LA-AA), pan suplementado con masa madre fermentada tipo poolish con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B- 4495 (BPA) o *Lactobacillus casei* 21/1 (BPC) durante el almacenamiento a 25 °C. 77

Figura 12. SDS-PAGE de las diferentes fracciones proteicas neutralizadas y fracciones proteicas no tratadas obtenidas a partir de masas madre fermentadas con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496. Carriles: MW, peso molecular; 1, fracción D neutralizada (< 10 kDa); 2, fracción A neutralizada (>10 kDa); 3, fracción C neutralizada (< 30 kDa); 4, fracción B neutralizada (>30 kDa); 5, fracción D (< 10 kDa); 6, fracción A (> 10 kDa); 7, fracción C (< 30 kDa); 8, fracción B (>30 kDa). 94

Figura 13. Zonas de inhibición de *Penicillium corylophilum* y *P. chrysogenum* con el extracto acuoso (EA) (200 µL). A - control (Tween 0.1 %); B - EA neutralizado (EA-N); C - EA nativo y D - EA neutralizado e hidrolizado..... 100

Figura 14. Zonas de inhibición de *Penicillium corylophilum* de las diferentes fracciones proteicas (200 µL). A) fracción D (PM < 10 kDa); B) fracción C (PM < 30 kDa); C) fracción B (PM > 30 kDa); y D) fracción A (PM > 10 kDa). 101

Figura 15. Zonas de inhibición de *Penicillium chrysogenum* de las diferentes fracciones proteicas (200 µL). A) fracción D (PM < 10 kDa); B) fracción C (PM < 30 kDa); C) fracción B (PM > 30 kDa); y D) fracción A (PM > 10 kDa). 102

Esquema de la tesis

A continuación, se describe brevemente el esquema de la presente tesis de investigación en el área de Ciencia de Alimentos. En el apartado 1 se presenta una introducción general que expone el problema, un marco general de la problemática y los distintos enfoques de investigaciones que se han realizado en los últimos años. A continuación, en el apartado 2 se encuentran el objetivo general y los objetivos específicos establecidos a partir del análisis de la problemática presentada anteriormente.

En el apartado 3 se incluye los distintos artículos de investigación resultado del trabajo experimental realizado durante el doctorado. En primer lugar (apartado 3.1) se muestra el artículo que lleva como nombre “Masa madre tipo *poolish* con capacidad antifúngica suplementada con *Lactiplantibacillus plantarum* y sus extractos acuosos *in vitro* y pan” en el cual se evaluó la capacidad antifúngica de extractos acuosos (EA) de masas madre tipo *poolish* fermentadas con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 en caldo, agar y pan. Posteriormente, en el apartado 3.2 se presenta el segundo artículo de investigación que lleva por nombre “Actividad antifúngica de masa madre (Tipo II) de harina de trigo de dos *Lactobacillus* diferentes *in vitro* y pan” el cual tuvo como objetivo evaluar la capacidad antifúngica y características químicas de los extractos acuosos (EA) obtenidos de la fermentación con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495 o *L. casei* 21/1 de harina de trigo (masa madre tipo *poolish*). En la sección 3.3 se integra el tercer artículo de investigación denominado “Evaluación de la actividad antifúngica de extractos acuosos y fracciones proteicas de masa madre fermentada por *Lactiplantibacillus plantarum*” en el cual se analizaron la capacidad antifúngica de ácidos orgánicos y fracciones proteicas derivadas de masa madre fermentada con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496.

En el apartado 4 se incluyen las conclusiones generales del tema tratado en la tesis de investigación, así como, una serie de recomendaciones para trabajos a futuro siguiendo la línea de investigación sobre las fermentaciones de masas madre y la producción de compuestos bioactivos con capacidad antimicrobiana. Finalmente, en el apartado 5 se integran todas las evidencias de productos de investigación que contemplan artículos de

investigación, artículos de revisión, participaciones en congreso y participaciones de divulgación científica.

Resumen

En un contexto de búsqueda constante de métodos seguros y sostenibles para conservar los alimentos, se llevó a cabo esta investigación sobre las propiedades antifúngicas de extractos acuosos (EA) y fracciones proteicas derivadas de fermentaciones de masa madre tipo *poolish*. Este estudio se centró en evaluar la eficacia antifúngica de los extractos y fracciones obtenidas a partir de fermentaciones con diferentes cepas de lactobacilos, específicamente *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496, *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, y *Lactobacillus casei* 21/1.

Se evaluó la capacidad antifúngica de los EA obtenidos de masas madre tipo *poolish* fermentadas con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496. Los resultados indicaron que estos extractos acuosos poseen una fuerte actividad antifúngica, inhibiendo significativamente el crecimiento de mohos como *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium corylophilum* y *Aspergillus niger*. Este efecto fungistático se atribuyó principalmente a la presencia de ácidos láctico y acético, así como posiblemente a péptidos antifúngicos presentes en los EA. Además, la adición de masa madre tipo *poolish* en la fabricación de pan demostró prolongar la vida útil del producto al inhibir el crecimiento de mohos durante un período de diez días.

Por otro lado, se exploraron las propiedades químicas y antifúngicas de los EA obtenidos de fermentaciones con *L. acidophilus* NRRL B-4495 y *L. casei* 21/1. Se observó que la adición de estas cepas afectó el pH y la acidez titulable de las masas madre, en el *poolish* fermentado con *L. casei* se observaron valores más bajos de pH y mayores niveles de acidez. Los análisis químicos identificaron ácido láctico y ácido acético como los principales componentes en los EA, con concentraciones que variaban dependiendo de la cepa utilizada. Se encontró que concentraciones entre el 25% y el 50% de EA redujeron significativamente la tasa de crecimiento radial de los mohos evaluados (*Penicillium chrysogenum* y *Penicillium corylophilum*), especialmente cuando se utilizó *L. acidophilus* en la fermentación.

Además, se investigó el potencial antifúngico de fracciones proteicas derivadas de las fermentaciones de masa madre tipo *poolish* con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496. Se encontró que estas fracciones proteicas, especialmente aquellas con un peso molecular superior a 30 kDa, exhibieron una fuerte capacidad antifúngica contra *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium corylophilum*. La neutralización e hidrólisis de estas fracciones resultaron en una disminución significativa de su actividad antifúngica, destacando la importancia de los ácidos orgánicos en la actividad antifúngica y de las fracciones proteicas. Los hallazgos de esta investigación sugieren que tanto los extractos acuosos como las fracciones proteicas derivadas de fermentaciones de masa madre tipo *poolish* con cepas específicas de lactobacilos representan alternativas prometedoras como agentes antifúngicos naturales en la industria de la panificación. Estos hallazgos no solo tienen implicaciones para la seguridad alimentaria al reducir la dependencia en los conservadores sintéticos, sino que también fomentan prácticas más sostenibles en la producción de alimentos, específicamente en productos de panificación.

Abstract

In the constant search for safe and sustainable methods to preserve food and examine natural alternatives for antimicrobial agents, this research was carried out on the antifungal properties of aqueous extracts (AE) and protein fractions derived from *poolish* sourdough fermentations. This study focused on evaluating the antifungal efficacy of extracts and fractions obtained from fermentations with different strains of lactobacilli, specifically *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496, *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, and *Lactobacillus casei* 21/1.

The antifungal capacity of AEs obtained from *poolish*-type sourdoughs fermented with *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 was evaluated. The results indicated that these aqueous extracts possess strong antifungal activity, significantly inhibiting the growth of molds such as *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium corylophilum*, and *Aspergillus niger*. This fungistatic effect was mainly attributed to the presence of lactic and acetic acids, and possibly to antifungal peptides present in AEs. Additionally, the addition of *poolish* sourdough in bread making was shown to prolong the product's shelf life by inhibiting mold growth over ten days.

Besides, the chemical and antifungal properties of AEs obtained from fermentations with *L. acidophilus* NRRL B-4495 and *L. casei* 21/1 were explored. It was observed that the addition of these strains affected the pH and titratable acidity of the sourdoughs; in the *poolish* fermented with *L. casei*, lower pH values, and higher acidity levels were observed. Chemical analyses identified lactic acid and acetic acid as the main components in the AEs, with concentrations varying depending on the strain used. It was found that concentrations between 25% and 50% of AE significantly reduced the radial growth rate of the molds evaluated (*Penicillium chrysogenum* and *Penicillium corylophilum*), mainly when *L. acidophilus* was used in the fermentation.

Furthermore, the antifungal potential of protein fractions derived from *poolish* sourdough fermentations with *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 was investigated.

These protein fractions, especially those with a molecular weight greater than 30 kDa, exhibited strong antifungal capacity against *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium corylophilum*. The neutralization and hydrolysis of these fractions resulted in a significant decrease in their antifungal activity, highlighting the importance of organic acids and protein fractions in the antifungal activity.

The findings of this research suggest that both aqueous extracts and protein fractions derived from *poolish* sourdough fermentations with specific strains of lactobacilli represent promising alternatives as natural antifungal agents in the baking industry. These findings have implications for food safety by reducing reliance on synthetic preservatives and encouraging more sustainable food production practices, specifically bakery products.

1.Introducción

El pan es uno de los alimentos que forma parte importante de la dieta de la población mundial; en el caso de México, si bien el pan no es la fuente principal de carbohidratos de la dieta del mexicano, es uno de los alimentos que se consume con una alta frecuencia y el cual se encuentra fuertemente arraigado en las tradiciones culinarias del país. En general, el pan es un producto alimenticio que presenta una desventaja importante, su vida de anaquel es muy corta, y esto se debe principalmente a dos fenómenos: el crecimiento de mohos en la superficie y el envejecimiento del pan, este último inicia tan sólo unas horas después de haber elaborado el producto.

Debido a estos dos fenómenos, la industria de la panificación ha utilizado por muchos años la incorporación de agentes antimicrobianos y aditivos químicos a la formulación de los panes, con el propósito de aumentar la vida de anaquel y mantener los atributos de calidad. Sin embargo, la reciente demanda de productos orgánicos, libres de aditivos químicos, o actualmente de los conocidos como productos de “etiqueta limpia”, ha generado una readaptación de las formulaciones y procesos en la industria de la panificación, con el objetivo de satisfacer las demandas de los consumidores.

Una alternativa que se han investigado en años recientes es la utilización de aceites esenciales como agentes antimicrobianos para extender la vida de anaquel de los productos de panificación, demostrando la capacidad que presentan estos aceites tanto para inhibir el crecimiento de mohos, como para extender la vida útil del pan. De igual forma, se ha estudiado de manera extensa, la utilización de temperaturas de refrigeración y congelación en pan parcialmente horneado, demostrando también ser una alternativa positiva para aumentar la vida de anaquel de los productos de panadería. Sin embargo, ambas tecnologías presentan desventajas muy importantes relacionadas con las características organolépticas del pan. Por un lado, la incorporación de aceites esenciales a la formulación del pan, afecta de manera significativa el sabor final del mismo, pudiendo generar cierto rechazo por parte del consumidor. En cuanto al pan parcialmente horneado, una vez que el pan es completamente horneado, los cambios de textura, en específico la firmeza del pan,

aumenta de manera significativa. Este fenómeno ha sido adjudicado al aumento en la velocidad de retrogradación del almidón provocado por las temperaturas de refrigeración, o al rompimiento de la red de gluten generado por la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación.

Por otra parte, en países de Europa por muchos años y de manera tradicional, se ha utilizado la incorporación de masas madre para la elaboración de pan, ya que estas mejoran algunas de las características organolépticas del pan, como el sabor, color, olor y textura. Las masas madre o masas agrias (*sourdough*), son el resultado de fermentaciones ácido lácticas principalmente, que ocurren de manera espontánea cuando harinas de diferentes granos (trigo y/o cebada) se mezclan con una cantidad considerable de agua y en condiciones favorables, se promueve el crecimiento de microorganismos, en específico de levaduras y bacterias ácido lácticas propias de las harinas. Se ha demostrado que, durante estas fermentaciones, se generan compuestos como ácidos orgánicos y compuestos peptídicos, que presentan un efecto antimicrobiano.

La demanda por parte de los consumidores de alimentos con etiquetas limpias y las mejoras en la vida de anaquel y características de calidad que ha presentado el pan adicionado con masas madre, hacen de esta alternativa una opción viable para la fabricación de productos de panadería libre de agentes conservadores sintéticos. Por esta razón, en el presente trabajo se ha considerado estudiar la capacidad que tiene las masas madre fermentadas con distintas cepas de *Lactobacillus* (*Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496, *Lactobacillus casei* 21/1 y/o *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495) y sus extractos acuosos para inhibir el crecimiento de mohos en el pan y de esta manera mejorar la vida útil del producto, así como evaluar las características fisicoquímicas y sensoriales de los panes.

2 . Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica de los compuestos bioactivos producidos durante la elaboración de masas madre tipo “*polish*” fermentadas con distintas bacterias ácido lácticas, así como el efecto de la adición de masas madre o sus extractos sobre algunas características y vida útil de hogazas de pan.

2.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto sobre pH, acidez titulable y producción de ácidos orgánicos en las masas madre tipo *polish* al ser fermentadas durante 24, 48 y 72 horas con *Lb. plantarum* NRRL B-4496, *Lb. acidophilus* NRRL B-4495 y *Lb. casei* 21/1 de manera individual.
2. Estudiar el efecto antifúngico *in-vitro* de los extractos acuosos obtenidos de la fermentación de las masas madre tipo *polish fermentadas con Lb. plantarum* NRRL B4496, *Lb. acidophilus* y *Lb casei* 21/1 de manera individual sobre la inhibición de *A. niger*, *P. chrysogenum* y *P. corylophilum*.
3. Estudiar el efecto que provoca la adición en la formulación de masas madre tipo *polish* sobre las características microbiológicas y vida de anaquel de hogazas de pan.
4. Analizar la capacidad antifúngica de ácidos orgánicos y fracciones proteicas de masa madre fermentada con *Lactplantibacillus plantarum* NRRL B-4496.

3. Artículos de investigación

3.1 Masa madre tipo poolish con capacidad antifúngica suplementada con *Lactiplantibacillus plantarum* y sus extractos acuosos in vitro y pan

Resumen

El objetivo de este artículo fue evaluar la capacidad antifúngica de extractos acuosos (EA) de masas madre tipo *poolish* fermentadas con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 en caldo, agar y pan. Los extractos acuosos se obtuvieron mediante centrifugación y separación del sobrenadante de las masas madre *poolish* una vez finalizado el tiempo de fermentación. Los extractos acuosos inhibieron el 80% del crecimiento de *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium corylophilum* y <20% para *Aspergillus niger* en caldo. Los EA retrasaron la tasa de crecimiento radial y aumentaron el tiempo de retraso para iniciar el crecimiento de los tres mohos probados. La adición de masa madre tipo *poolish* inhibió el crecimiento de hongos en el pan durante diez días. La capacidad fungistática de los extractos se atribuyó principalmente a los ácidos láctico y acético y probablemente a los péptidos antifúngicos que se encuentran en el EA. La masa madre de *L. plantarum* es una alternativa al propionato de calcio como antifúngico.

3.1.1 Introducción

Hoy en día, la demanda de alimentos orgánicos y libres de aditivos sintéticos ha llevado a la búsqueda de alternativas antimicrobianas naturales. En el caso de los productos de panadería, los consumidores quieren panes libres de aditivos sintéticos. Sin embargo, el pan tiene una vida útil corta debido al crecimiento de mohos [1,2]. Las masas madre resultan de la fermentación de harina de cereales con bacterias ácido lácticas (BAL) y/o levadura, comúnmente utilizadas como ingrediente en la fabricación de pan [3]. Existen diferentes tipos de masas madre; Las masas madre tipo *poolish* (Tipo II) son el resultado de la inoculación de una mezcla harina-agua con diferentes tipos de BAL y la adición o no de *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentación de estas masas madre se produce a

temperaturas superiores a la temperatura ambiente y normalmente dura de uno a tres días [4]. El uso de masa madre en la elaboración de productos de panadería es una alternativa ya que, desde hace muchos años y tradicionalmente, la masa madre se ha utilizado en la elaboración de pan, mejorando propiedades organolépticas como sabor, color y textura. Las BAL son microorganismos comúnmente aislados de masas madre y son importantes por su producción de ácidos orgánicos, entre otros compuestos.

El proceso de fermentación del ácido láctico en masas madre depende directamente del tipo de microorganismo fermentador. Las BAL aisladas en estas masas se pueden clasificar según las reacciones glucolíticas llevadas a cabo en la vía metabólica de la glucólisis en homofermentativas y heterofermentativas [5]. Algunos estudios han demostrado que durante la fermentación de masas madre, las BAL heterofermentativas producen ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂. Además, las BAL presentes en las masas madre tienen proteasas, peptidasas y enzimas productoras de péptidos y aminoácidos, que descomponen las proteínas de los cereales produciendo compuestos con propiedades bioactivas como las bacteriocinas [6]. Diferentes estudios han demostrado que los ácidos orgánicos como el acético, el láctico y el fenil láctico tienen un efecto antimicrobiano y, en algunos casos, un efecto antifúngico [6–8].

El sobrenadante libre de células (SLC) se refiere al líquido transparente obtenido después del crecimiento de una BAL específica en un medio líquido o semilíquido después de centrifugación y filtración (0.45 µm) [9]. Los extractos acuosos (EA) de masa madre son el líquido sobrenadante libre de células resultante de la centrifugación y filtración. Además, los EA de las masas madre han demostrado la capacidad de disminuir el crecimiento de un gran número de mohos responsables del deterioro de los productos de panadería o mejorar las propiedades fisicoquímicas de los productos [10-12]. Estudios anteriores han demostrado que los EA de masas madre fermentadas con *Lactobacillus plantarum* CRL 759 podrían disminuir (>40%) el crecimiento radial de *Aspergillus niger* [1]. De manera similar, Rizzello et al. [13] observaron que los EA obtenidos a partir de masas madre adicionadas con germen de trigo y fermentadas con *Lactobacillus plantarum* LB1 y *Lactobacillus rossiae*

LB5 retrasaban el crecimiento de algunos de los mohos más relevantes en productos horneados.

También se ha investigado el uso directo de masas madre fermentadas en la formulación de pan para frenar el crecimiento de microorganismos perjudiciales. Luz et al. [12] informaron que la adición a la formulación de pan de una masa madre formulada con suero y fermentada con *L. plantarum* CECT 749 o *Lactobacillus bulgaricus* CECT 4005, aumentó su vida útil en 2 o 4 días, respectivamente. Asimismo, observaron que durante la fermentación de masa madre con ambas especies de *Lactobacillus* se formaban diferentes ácidos orgánicos relacionados con la capacidad de retardar el crecimiento de varias especies de *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus*. Si bien, las masas madre y sus extractos acuosos han exhibido actividad antimicrobiana; sin embargo, pocos estudios investigaron la actividad antifúngica del extracto acuoso y la masa madre. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antifúngica *in vitro* y en pan de los EA obtenidos de masas madre tipo *poolish* suplementadas con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 frente a *A. niger*, *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium corylophilum*, además de determinar las propiedades fisicoquímicas del pan.

3.1.2 Materiales y Métodos

3.1.2.1 Condiciones de cultivo y preparación de extracto acuoso.

Lactiplantibacillus plantarum NRRL B-4496 (antes *Lactobacillus plantarum*, [14]) se adquirió en forma liofilizada de la USDA (Servicio de Investigación Agrícola, Peoria, IL). La cepa se cultivó en caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS) (Difco™, BD, Sparks, MD, EE. UU.) a 35 °C durante 48 h sin agitación. Las células se obtuvieron mediante centrifugación a 7000 x *g* durante 25 minutos a 5 °C (Marathon 21K/R, Fischer Scientific, Alemania) y se usaron para formular la masa madre tipo *poolish*. La masa madre se preparó a partir de una formulación estándar utilizando harina de trigo refinada (contenido de proteína de 11.1 g/100 g) y agua en partes iguales (1:1) y 1% (p/p) del sedimento de células húmedas de *L. plantarum*. Los ingredientes se mezclaron hasta obtener una masa homogénea y se fermentó a 35 °C

durante 24 (PD24), 48 (PD48) o 72 (PD72) h. Se probaron diferentes tiempos de fermentación para identificar si la actividad antifúngica dependía del tiempo de fermentación. Para obtener el EA, las masas madre se centrifugaron a 7000 x g durante 25 min a 5 °C y se filtraron a través de un filtro de nitrato de celulosa de 0.45 µm (Advantec, MFS, Dublin, CA, EE. UU.). Los EA se almacenaron a -18 °C hasta su uso.

A. niger, *P. chrysogenum* y *P. corylophilum* se obtuvieron del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de las Américas Puebla. Los mohos se cultivaron en agar papa dextrosa (PDA; Bioxon, BD, Estado de México, México) durante 7 días a 25 °C. Se vertieron 5 ml de una solución estéril de Tween 80 (0.4 % p/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) sobre la superficie de cada cultivo de moho, el cultivo se agitó suavemente durante 2 minutos para favorecer la recolección de las esporas. Se utilizó un hemocitómetro y un microscopio óptico para determinar el número de esporas en la suspensión por mililitro. El número de esporas se ajustó a 10⁴ esporas/ml con solución de Tween.

3.1.2.2 *Determinación de pH, acidez titulable y azúcares reductores de extractos acuosos (EA)*

El pH se midió mediante inmersión del electrodo con un medidor de pH (HI 2210 Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EE. UU.) siguiendo el método AACCI 02-52 [15]. La acidez titulable total se determinó según el método AACCI 02-31 [15], y los resultados se expresaron como miligramos de ácido láctico por ml de muestra. Los azúcares reductores se cuantificaron siguiendo el método de Lane-Eynon (31.036, AOAC, [16]). Las mediciones se realizaron por triplicado.

3.1.2.3 *Inhibición de moho en medios líquidos*

El método se realizó según lo descrito por Luz et al. [12] con algunas modificaciones. En cada pocillo de una microplaca (96 pocillos) se colocaron 100 µL de caldo de extracto de malta y 50 µL de inóculo (1x10⁴ esporas/ml); luego se agregaron 12 concentraciones (0, 5, 9, 14, 19,

23, 28, 33, 37, 42, 46 y 50 %) de EAs en base a 300 μ L del volumen total del pozo. Cada pocillo se ajustó con agua esterilizada hasta el volumen final. Las placas se incubaron a 25 °C durante 3 días y la DO₆₃₀ se midió diariamente con un lector automático de microplacas modelo ELx800 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE. UU.) para evaluar la actividad antifúngica. También se probaron como controles pocillos sin inóculo ni EA. Para verificar la inhibición del moho, se sembraron en PDA 25 μ l de cada pocillo con una DO \leq 0.3, se incubaron las placas a 25 °C durante 3 días y se contaron los supervivientes. Para identificar los compuestos antifúngicos en los EA, los EA se neutralizaron con una solución de NaOH al 40 % (p/v) hasta un pH de 6.5. Posteriormente, se evaluó la actividad antifúngica como se describió anteriormente. De manera similar, para determinar si el compuesto responsable era similar a un péptido, se mezclaron 10 ml de EA neutralizado con una solución de proteinasa K de 20 μ g/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) antes de la incubación a 37 \pm 1 °C durante 1h. Después de esto, el EA tratado se calentó (121 °C) durante 5 minutos [17]. Posteriormente, se evaluó la actividad antifúngica como se describió anteriormente.

3.1.2.4 Inhibición del crecimiento radial de moho

Para esta prueba, el EA de la masa madre tipo *poolish* se centrifugó a 7000 x *g* durante 25 min a 5 °C y el sobrenadante se pasteurizó (PPD) a 100 °C durante 1 min. Se mezcló PDA fundido estéril con EA en cuatro concentraciones (20, 26, 33 y 50 % v/v). Cada mezcla de agar-EA se vertió en placas de Petri y se inoculó con 5 μ l de suspensión de esporas (1x10⁶ esporas/ml) en el centro de la placa. La medición del diámetro de la colonia se realizó en tres puntos de la colonia en crecimiento cada 24 horas hasta que el crecimiento del moho alcanzó el diámetro total de la placa. El crecimiento radial de los mohos se modeló con la ecuación de Gompertz modificada (Ec.1) [18], y los parámetros del modelo se ajustaron mediante regresión no lineal.

$$\ln \frac{D}{D_0} = A \times \exp \left[- \exp \left[\left(\frac{\mu \times e}{A} \right) (\lambda - t) + 1 \right] \right] \quad Eq. 1$$

Donde: μ es la tasa máxima de crecimiento (1/h), A es el diámetro máximo observado (mm), λ es la fase de adaptación o tiempo de retraso (h), D es el diámetro de la colonia (mm) en el tiempo t (h), D_0 es el diámetro de la colonia en el momento 0 y e es el “número de Euler” ($\exp 1$). Para analizar la bondad de ajuste de los modelos, se calcularon los residuales y los coeficientes de correlación (R^2) con el software Minitab 20 (Minitab LLC, State College, PA, EE. UU.).

3.1.2.5 Análisis de ácidos láctico y acético en extractos acuosos

El análisis y cuantificación de la concentración de ácidos láctico y acético se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un cromatógrafo Agilent 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) equipado con un detector de matriz de diodos (DAD) programado a una longitud de onda de 210 nm. De los EA filtrados se tomaron muestras con un muestreador automático Agilent G1329 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) y el volumen de inyección fue de 20 μ l. La separación de compuestos se realizó en una columna Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm) (BIO-RAD, Hercules, CA, EE. UU.) utilizando una solución tampón de fosfato potásico monobásico (20 mM) (pH 2.4, ajustado con ácido fosfórico) como fase móvil isocrática a 0.6 ml/min a temperatura ambiente. Para la cuantificación del ácido láctico, acético, propiónico, butírico y piroglutámico, se prepararon soluciones estándar de cada ácido a 30-400 mM. El área del pico para cada solución se correlacionó con la concentración mediante un ajuste lineal. Para los estándares, los coeficientes de correlación (R^2) fueron >0.99 .

3.1.2.6 Procedimiento de panificación

Para la formulación del pan se utilizó harina de trigo 38%, agua 23%, levadura 1% y masa madre tipo poolish 28%. Los ingredientes se mezclaron y amasaron usando una mezcladora/amasadora Legacy HL200 (Hobart, EE. UU.) durante 30 min hasta obtener una masa flexible y elástica. Después, la masa se dividió en trozos (100 g), se redondearon y se les dio forma manualmente en trozos en forma de hogaza. Los trozos de pan formados se colocaron en el horno fermentador del Mini combo (Zucchelli Alpha, Italia) durante 60 min

a 30 °C y 65 % de humedad relativa. A continuación, se realizó el proceso de horneado a 200 °C durante 18 min en el horno eléctrico Mini combo (Zucchelli Alpha, Italia). Luego, el pan se enfrió a temperatura ambiente durante 60 min. Finalmente, el pan se almacenó durante 14 días temperatura ambiente en bolsas de polietileno selladas.

3.1.2.7 Determinación del pH, humedad y a_w del pan

Para la determinación del pH del pan se utilizó un medidor de pH modelo HI2210 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) siguiendo el método 02-52 de la AACCI [15]. Para las pruebas de humedad y a_w , de la miga y de la corteza de los panes se separaron y analizaron individualmente. El contenido de humedad se determinó siguiendo el método AOAC 930.15 [16]. Para el análisis de a_w se utilizó el equipo AquaLab 4TEV Series (Meter Food, Pullman, WA, EE. UU.). Las mediciones de pH se llevaron a cabo los días 0 y 14 de almacenamiento y a_w a los días 0, 1, 4 y 14. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.1.2.8 Actividad antifúngica en el pan.

Las hogazas de pan envasados se examinaron diariamente durante 28 días o hasta que se detectó crecimiento de moho en la superficie.

3.1.2.9 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con Análisis de Varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) utilizando el software Minitab 20 (Minitab LLC, State College, PA, EE. UU.).

3.1.3 Resultado y discusión

3.1.3.1 pH acidez titulable y azúcares reductores de los EA

En la Tabla 1 se muestran los resultados de pH, acidez titulable (AT) y azúcares reductores para las diferentes masas tipo *poolish* fermentadas con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496. A medida que aumentó el tiempo de fermentación, el pH disminuyó y el TA aumentó

debido a la formación de ácidos orgánicos por *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496. Las masas madre fermentadas durante 48 h (Poolish Dough, PD48h) y 72 h (PD72h) mostraron los valores de pH más bajos y, por tanto, los valores más altos de acidez titulable, los cuales fueron similares ($p > 0.05$). La masa control sin *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 mostró un pH más alto. Settanni et al. [19] obtuvieron resultados similares de pH (4.0 – 3.7) y AT (1-1.3 % p/v) para masas madre inoculadas con *L. plantarum* PON 100274 y fermentadas durante 21 h. De manera similar, observaron un aumento en la AT de las masas madre, lo que confirma que el cambio de pH estaba directamente relacionado con la producción de ácidos orgánicos por parte de *L. plantarum*, como ácido láctico (1.3-4 mg/g) y ácido acético (0.15 – 0.80 mg/g).

Tabla 1. pH, acidez titulable y azúcares reductores para diferentes masas fermentadas con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496

	pH	Acidez titulable (%)	Azúcares reductores(g/g _{100 muestra})
Control	4.62 ± 0.05a	0.36 ± 0.06b	0.15 ± 0.01c
PD 24 h	3.76 ± 0.04b	1.27 ± 0.09a	1.48 ± 0.04b
PD 48 h	3.64 ± 0.01c	1.40 ± 0.08a	2.10 ± 0.07a
PD 72 h	3.63 ± 0.02c	1.40 ± 0.09a	2.12 ± 0.20a

PD: masa *poolish*. Letras diferentes muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre muestras. La acidez titulable se calculó en porcentaje peso/volumen (% p/v) como ácido láctico.

Los carbohidratos más representativos de la harina de trigo son almidón, maltosa, sacarosa, glucosa y fructosa [20]. Durante la fermentación ácido láctica de la masa madre, las enzimas de las BAL, especialmente hidrolasas y fosfohidrolasas, comienzan a separar la maltosa de la harina refinada generando azúcares reductores, los cuales son necesarios para la actividad metabólica de las BAL [6]. El contenido de azúcar reductor de las masas madre preparadas con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 (Tabla 1) confirma el proceso de hidrólisis durante la fermentación, que fue dependiente del tiempo. Como era de esperar,

la masa control presentó la menor concentración de azúcares reductores. Belz et al. observaron resultados similares [21] en masas madre fermentadas con *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280. Las masas madre fermentadas con *L. amylovorus* presentaron una elevada cantidad de azúcares reductores (glucosa, fructosa y maltosa).

3.1.3.2 Actividad antifúngica por DO_{630nm} y recuentos microbianos

A partir de pruebas de densidad óptica utilizando 12 concentraciones de EA contra mohos, se determinó que las concentraciones con alta inhibición fueron 20, 26 y 33%, las cuales inhibieron entre 76-98% el crecimiento de los mohos. Estas tres concentraciones se utilizaron para los recuentos en placa. La Figura 1 muestra los porcentajes de inhibición para cada moho analizado. Como se puede observar, el moho que presentó mayor resistencia a los EA fue *A. niger* y la inhibición fue <20%. El tiempo de fermentación y la concentración de EA no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) para este moho. En general, los extractos PD48 y PD72 tuvieron un gran porcentaje de inhibición (>85%) contra *P. chrysogenum* y *P. corylophilum*, y no se observaron diferencias significativas en comparación con el propionato de calcio (CP). Sólo el EA al 20% obtenido de la masa PD48 presentó una inhibición <85% contra *P. chrysogenum* y fue significativamente diferente ($p < 0.05$) al utilizar 26 o 33%. Por el contrario, el extracto PD24 mostró la inhibición más baja (<80%) y fue significativamente diferente ($p < 0.05$) de PD48 y PD72. Ninguno EA inhibe completamente el crecimiento de los mohos estudiados.

Así, los EA obtenidos a partir de masas madre fermentadas con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 tienen una capacidad fungistática lo cual concuerda con los estudios de Cizekiene et al. y Gerez et al. [22,23]. Por otra parte, Demirbaş et al. [24] encontraron que los sobrenadantes libres de células (SLC) de *L. plantarum* N-15 inhibían fuertemente la formación de esporas y el crecimiento micelar de *P. chrysogenum*. La actividad antifúngica de las BAL se atribuye a la producción de ácidos orgánicos y al bajo pH que afectan la fuerza motriz de los protones en la membrana celular, lo que lleva a una disminución del crecimiento fúngico [25]. En base a estos resultados, se realizaron más pruebas con el extracto PD48.

La Figura 2 muestra el efecto del extracto PD48 sobre el crecimiento de moho medido por densidad óptica. Para *A. niger*, todas las concentraciones de EA aumentaron la fase lag (retraso de crecimiento). Sin embargo, después de 72 h de incubación, la DO para todas las concentraciones fue mayor que la del control y la de CP. Este fenómeno probablemente se deba al mayor contenido de azúcares reductores en el extracto que los mohos pueden utilizar como fuente de carbono. Por el contrario, la concentración de los compuestos antimicrobianos no fue suficiente para inhibir el crecimiento [9].

Como se esperaba, todas las concentraciones analizadas de PD48 EA mostraron un aumento en la fase de lag de *P. chrysogenum* y *P. corylophilum*, con una DO más baja en comparación con el control después de 72 h (Figura 2). Asimismo, el SLC obtenido de la fermentación de harina de trigo hidrolizada (HTH) retrasó 100% el crecimiento de *P. corylophilum* [7,9]. En el presente trabajo, los EA no inhibieron el 100% del crecimiento de *P. corylophilum*, probablemente debido a que se utilizó harina no hidrolizada para la fermentación de *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496, lo que limitó la síntesis de metabolitos (ácidos orgánicos y otros).

Por otro lado, el EA neutralizado mantuvo su capacidad inhibidora frente a los mohos probados. La Figura 3 muestra la inhibición del moho en tres concentraciones de EA neutralizado (PD48N) que son similares ($p > 0.05$) a los EA nativos para *A. niger* y *P. corylophilum*; sólo el EA neutralizado al 20% (PD48N) en *P. chrysogenum* presentó una alta inhibición significativa ($p < 0,05$) en comparación con el EA nativo (PD48) a la misma concentración.

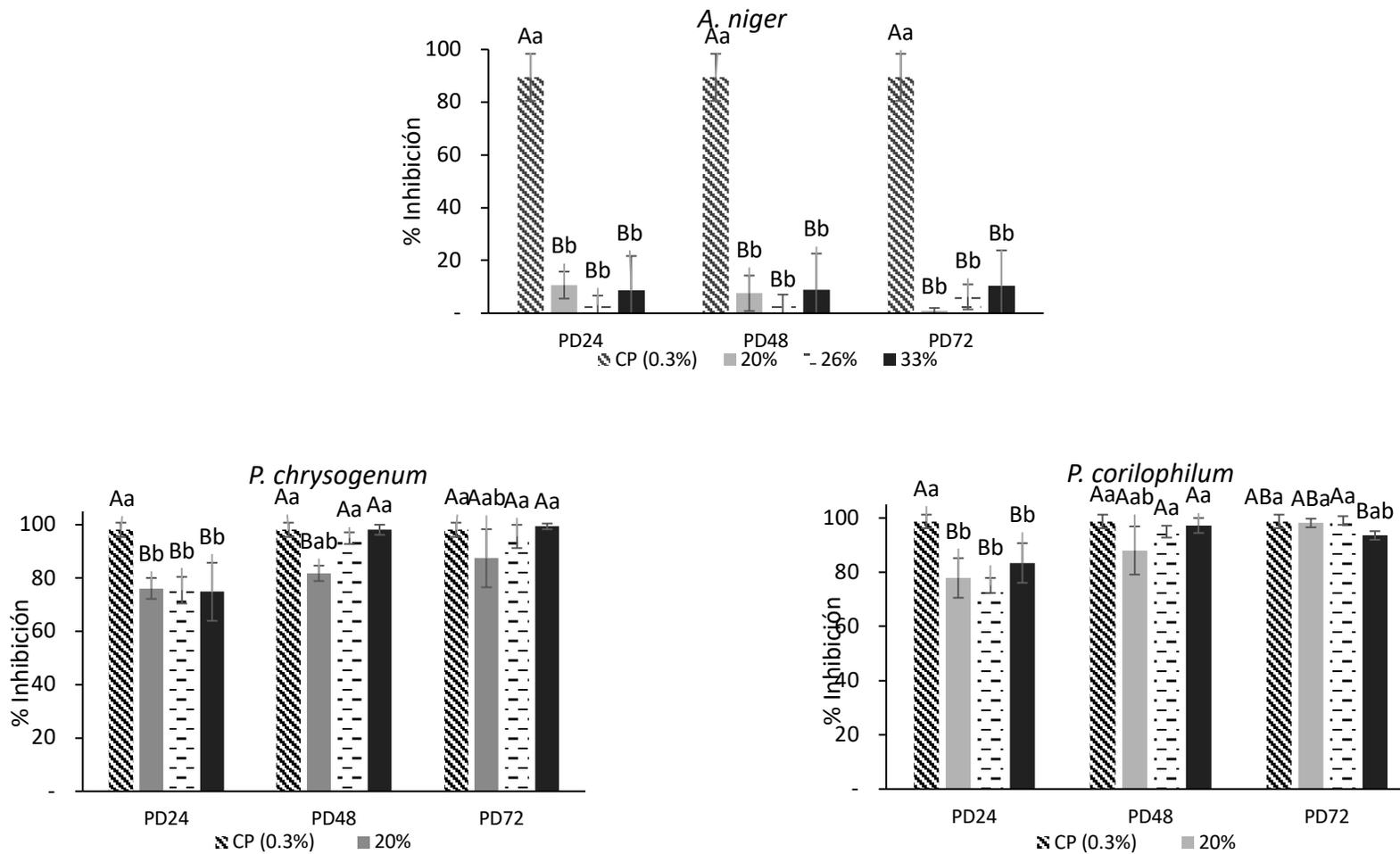
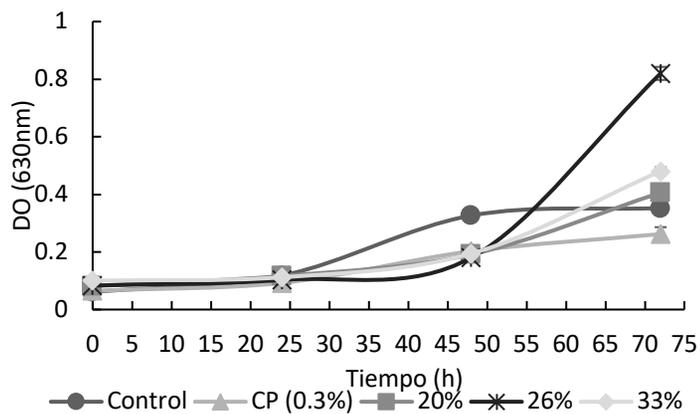
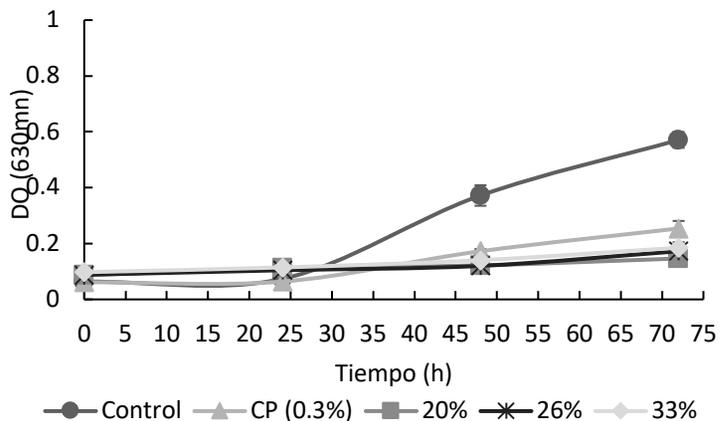


Figura 1. Porcentaje de inhibición (recuentos en placa) de extractos acuosos (EA) obtenidos de la masa tipo poolish (PD) fermentada con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 a las 24, 48 y 72 h en tres concentraciones y propionato de calcio (CP). Las distintas letras mayúsculas muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al tiempo de fermentación. Las letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la concentración de EAs en un mismo tiempo de fermentación

Aspergillus niger



Penicillium chrysogenum



Penicillium coriophilum

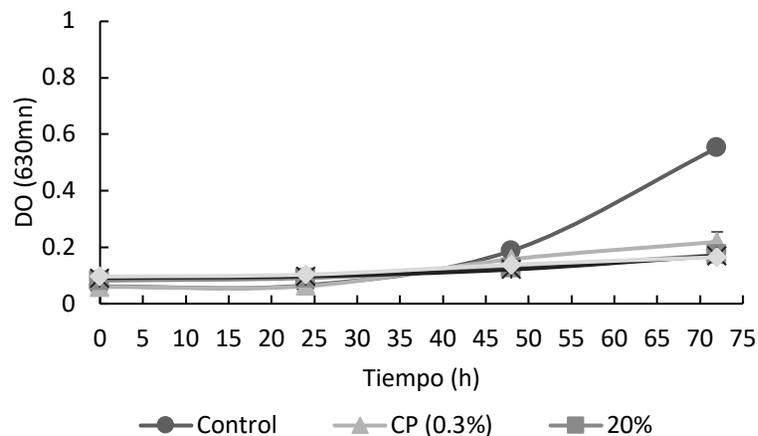


Figura 2. Efecto de diferentes concentraciones de extractos acuosos de masa madre tipo polish fermentada con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 a las 48 h y propionato de calcio (CP) sobre el crecimiento de mohos por densidad óptica a 630 nm.

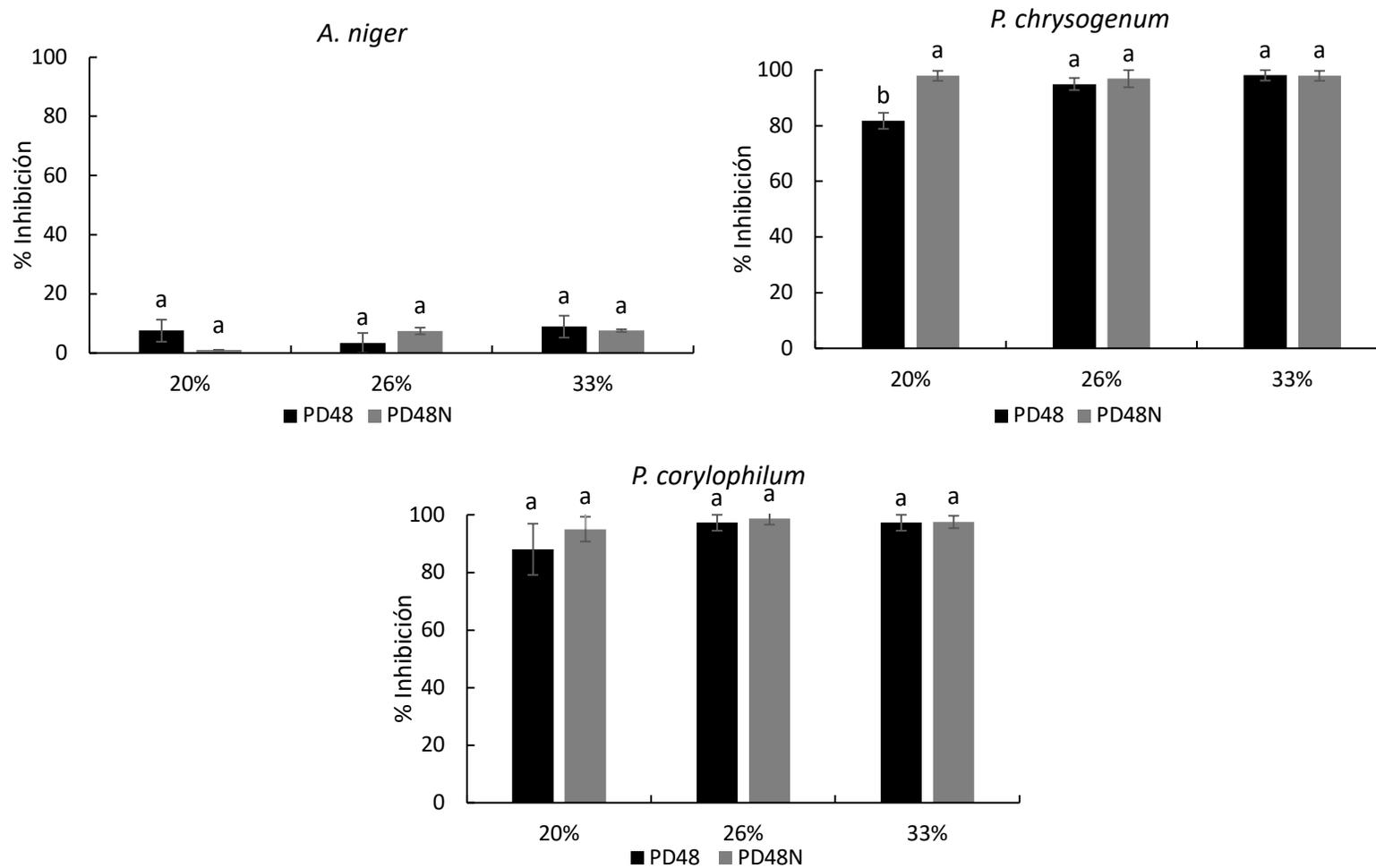


Figura 3. Porcentaje de inhibición (recuentos en placa) de extractos acuosos (EA) nativos (PD48) o neutralizados (PD48N) obtenidos de la masa madre fermentada con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 después de 48 h en tres concentraciones. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a los EA nativos o neutralizados

Los EA neutralizados tratados con proteinasa K perdieron su capacidad antifúngica frente a todos los mohos analizados. Hallazgos similares fueron reportados por Arrijo-Bretón et al. [17] para el SLC obtenido de *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 cultivado en caldo MRS, que mantuvo su actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas después de que el SLC se neutralizó a pH 6.5. Además, el SLC fraccionado de *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 cultivado en caldo MRS mostró compuestos proteicos antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes* Scott A [26]; por lo tanto, probablemente haya compuestos de proteína/polipéptido antifúngicos presentes en el EA. Asimismo, Rizzello et al. [13] observaron la actividad antifúngica de los extractos solubles en agua/sal o en metanol obtenidos de la fermentación del germen de trigo con *L. plantarum* LB1 y *L. rossiae* LB5 contra varios mohos aislados del pan. Registraron que la actividad antifúngica se debía a una actividad sinérgica y compleja entre los ácidos orgánicos y los compuestos peptídicos formados durante la fermentación del ácido láctico de los dos lactobacilos. Se deben realizar más investigaciones para identificar el compuesto antifúngico en este trabajo.

3.1.3.3 Inhibición del crecimiento radial de moho

La Tabla 2 muestra los parámetros de la ecuación de Gompertz modificada obtenidos del crecimiento radial de los mohos; en todos los casos, el ajuste del modelo de predicción fue excelente ($R^2 > 0.98$) (Figura 4). En general, la tasa de crecimiento (μ) disminuyó a medida que aumentó la concentración de PPD; *A. niger* fue el moho más resistente al PPD probado. La Figura 4 muestra que la tendencia creciente de *A. niger* es muy similar entre todas las concentraciones de PPD analizadas. Sin embargo, la incorporación del 33% de PPD tuvo la mayor inhibición contra *A. niger*. Además, la fase de retraso (λ) (Tabla 2) aumentó ligeramente cuando se utilizó 20, 26 o 50% de PPD. Russo et al. informaron resultados similares. [26] para *A. niger* tratado con SLC (12 % v/v) de diferentes cepas de *L. plantarum* cultivadas en caldo MRS; los niveles de inhibición fueron del 13 al 15%. Asimismo, Samapundo et al. [2] observaron que la adición de 3 % (p/v) de fermentados comerciales obtenidos de harinas de cereales disminuyó significativamente (20 - 25 %) el crecimiento

fúngico de *P. chrysogenum* y *P. paneum*. Como se esperaba, el propionato de calcio tuvo el mayor efecto sobre la tasa de crecimiento; sin embargo, no extendió la fase de retraso de crecimiento de *A. niger*.

El efecto fungistático del PPD fue más efectivo para *P. chrysogenum* y *P. corylophilum* (Figura 4) cuando se complementó al 50%. Las tasas de crecimiento de *P. chrysogenum* y *P. corylophilum* se retrasaron ~ 24% y 21%, respectivamente, mientras que la fase de retraso se extendió durante 24 h y 17 h, respectivamente. Aunque el CP mostró una buena actividad antimicrobiana contra *Penicillium*, el efecto fungistático del CP fue menor en comparación con el PPD: 33% para *P. chrysogenum* y 50% para *P. corylophilum*.

Tabla 2. Parámetros (μ tasa de crecimiento máxima; λ fase de retraso) de la ecuación de Gompertz modificada que describe el crecimiento de los mohos tratados a diferentes concentraciones de los extractos acuosos pasteurizados de masa madre tipo poolish fermentada con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496

<i>Aspergillus niger</i>					
	A	μ (h^{-1})	λ (h)	RMSE	R ²
Control	2.51 ± 0.018	0.063 ± 0.003	12.06 ± 1.3	0.01	0.995
Control CP	2.41 ± 0.040	0.029 ± 0.003	7.58 ± 3.8	0.03	0.983
20%	2.46 ± 0.026	0.057 ± 0.004	13.3 ± 1.9	0.02	0.991
26%	2.43 ± 0.032	0.055 ± 0.005	13.8 ± 2.5	0.02	0.987
33%	2.17 ± 0.029	0.035 ± 0.003	10.0 ± 2.8	0.02	0.988
50%	2.69 ± 0.028	0.033 ± 0.001	13.6 ± 2.1	0.02	0.995
<i>Penicillium chrysogenum</i>					
	A	μ (h^{-1})	λ (h)	RMSE	R ²
Control	2.62 ± 0.013	0.072 ± 0.003	14.07 ± 0.87	0.01	0.998
Control CP	2.66 ± 0.018	0.076 ± 0.004	16.41 ± 1.30	0.01	0.996
20%	2.51 ± 0.031	0.030 ± 0.002	13.80 ± 2.5	0.02	0.993
26%	2.46 ± 0.035	0.026 ± 0.001	10.30 ± 2.90	0.02	0.992
33%	2.47 ± 0.033	0.028 ± 0.002	17.14 ± 2.65	0.02	0.993
50%	2.50 ± 0.020	0.017 ± 0.005	24.42 ± 2.28	0.01	0.997
<i>Penicillium corylophilum</i>					
	A	μ (h^{-1})	λ (h)	RMSE	R ²
Control	2.63 ± 0.016	0.081 ± 0.004	15.65 ± 1.06	0.01	0.997
Control CP	2.62 ± 0.018	0.079 ± 0.005	16.89 ± 1.30	0.01	0.996
20%	2.50 ± 0.034	0.030 ± 0.002	12.96 ± 2.75	0.02	0.992
26%	2.47 ± 0.036	0.025 ± 0.002	12.79 ± 2.88	0.02	0.992
33%	2.45 ± 0.036	0.026 ± 0.002	10.60 ± 2.98	0.02	0.991
50%	2.66 ± 0.022	0.018 ± 0.001	17.20 ± 2.49	0.01	0.996

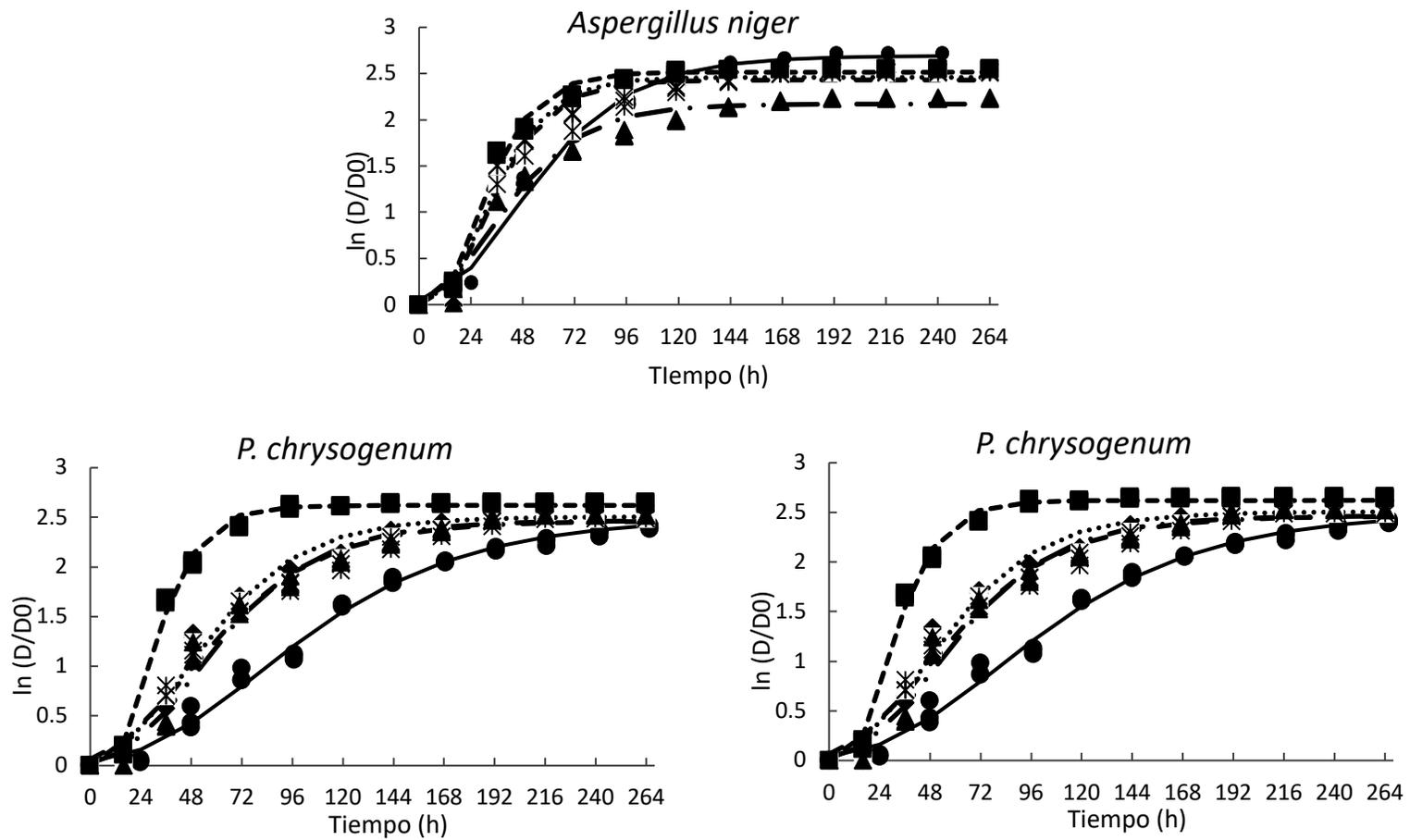


Figura 4. Efecto de las diferentes concentraciones de extractos acuosos (EA) pasteurizados de masa madre tipo poolish fermentada con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 durante 48 h sobre el crecimiento de los mohos probados. Agar papa dextrosa (PDA) control (■), PDA + 20% EA (●), PDA + 26% EA (*), PDA + 33% EA (▲), PDA + 50% EA (●) y líneas son los valores predichos utilizando la ecuación de Gompertz modificada

La capacidad fungistática de los SLC se debe principalmente al contenido de ácidos orgánicos como ácido láctico, ácido acético y ácido fenil láctico, entre otros, que provocan deformaciones y reducción de tamaño de las hifas, y en algunos casos, lesiones en el micelio del moho [9]. Sin embargo, estudios previos demostraron que los ácidos orgánicos tienen efectos débiles contra la formación de esporas y la germinación de diferentes especies de *Penicillium* [11,28]. La Figura 5 muestra el desarrollo de los mohos en agar suplementado con diferentes niveles de PPD o CP durante 72 o 192 h de incubación. Como se mencionó anteriormente, el PPD retrasó el crecimiento de los mohos (tamaño del diámetro de la colonia) y retrasó la formación de esporas y el desarrollo o abundancia de hifas como consecuencia de los compuestos antifúngicos (Figura 5). Sin embargo, en pequeñas colonias de moho, la formación de esporas del *Penicillium* no fue inhibida ni por el PPD ni por el CP. Para *A. niger*, sólo el CP disminuyó la formación de esporas.

3.1.3.4 Cuantificación de ácidos láctico y acético en extractos acuosos.

El análisis por HPLC reveló la presencia de ácido láctico y ácido acético en los EA (Tabla 3); Como era de esperar, el ácido láctico fue el principal en todos los extractos. Los extractos PD48 y PD72 tuvieron la mayor concentración de ácido láctico y ácido acético ($p < 0.05$), seguidos por la muestra PD24. Gerez et al. [29] informaron concentraciones más altas de ácido láctico y niveles similares de ácido acético para el SLC de varias cepas de *L. plantarum* cultivadas en caldo MRS durante 24 h. Registraron niveles de ácido láctico que oscilaban entre 216 y 236 mM y de ácido acético entre 13 y 28 mM. En los EA no se detectaron ácidos propiónico, butírico y piroglutámico. La producción de ácido orgánico durante la fermentación ácido láctica depende del género, especie, cepa y los sustratos disponibles de las BAL en el medio de crecimiento [30]. Por lo tanto, se esperaban niveles diferentes en la producción de ácidos orgánicos en comparación con informes anteriores.

Tabla 3. Concentraciones de ácido láctico y acético en los extractos acuosos de masa madre (PD) tipo poolish fermentada con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 a las 24, 48 o 72 h.

Masa madre	Ácido láctico (mM)	Ácido acético (mM)
PD24	77.35 ± 5.69b	19.93 ± 0.33b
PD48	187.83 ± 4.80a	35.49 ± 1.97a
PD72	185.17 ± 1.33a	36.08 ± 0.96a

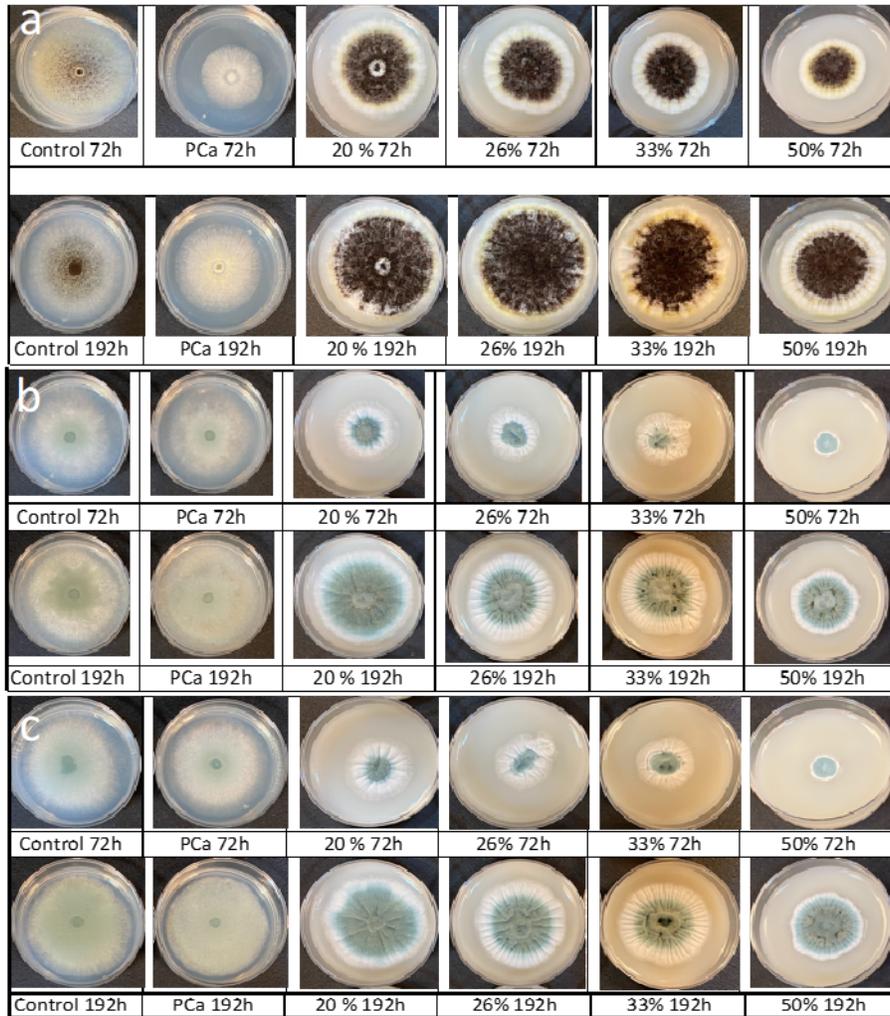


Figura 5. Crecimiento radial de mohos tratados con diferentes niveles de extractos acuosos pasteurizados de masa madre tipo poolish fermentada (48 h) con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 (20, 26, 33 o 50%) o propionato de calcio (PCa al 0.3%) después de de 72 y 192 h de incubación a 25°C. (a) *Aspergillus niger*, (b) *Penicillium chrysogenum* y (c) *Penicillium corylophilum*

3.1.3.5 Actividad antifúngica de masa madre tipo poolish fermentada con *L. plantarum* en pan

La Tabla 4 presenta el crecimiento de moho en piezas de pan durante el almacenamiento a 25 °C. Después de 5 días de almacenamiento, más del 80% de los panes de control mostraron crecimiento de hongos, mientras que los panes suplementados con masa madre PD48h (BPD 48h) estaban libres de moho. El 50% de los panes suplementados con masa madre tipo *poolish* con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 presentaron crecimiento de moho después de 10 o 14 d de almacenamiento. En la Figura 6 se muestran las piezas de pan control y las formuladas con masa madre tipo *poolish* durante el almacenamiento. La adición de masa madre PD48h a la formulación del pan extendió la vida útil en 6 días en comparación con el control. Resultados similares fueron reportados por Luz et al. [12] cuando se incorporó masa madre fermentada con *L. plantarum* CECT749 en la formulación de pan; la vida útil del pan se prolongó durante al menos 2 días.

Tabla 4. Crecimiento de moho en pan control y pan adicionado con masa madre fermentada tipo poolish con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496.

Tiempo (día)	% de crecimiento en pan	
	Control	BPD48h
3	0	0
4	64	0
5	82	0
7	100	0
8	100	0
9	100	0
10	100	50
12	-	50
14	-	50

3.1.3.6 pH del pan, contenido de humedad y a_w durante el almacenamiento

El pH del pan control fue de 6.25 (corteza) y 6.20 (miga), mientras que el pan con BPD48h en el tiempo cero tuvo un pH de 5.14 (corteza) y 5.16 (miga), estos valores se mantuvieron durante el almacenamiento. La Figura 7 muestra los valores del contenido de humedad y a_w de la corteza y miga de los panes control y PD48h durante el almacenamiento. Después del horneado, los panes control y PD48h tuvieron un contenido de humedad similar (miga y corteza), mientras que a_w fue menor para el pan PD48h (miga y corteza). En los productos de panadería almacenados se produce un fenómeno de transferencia de masa ya que el agua pasa de la miga a la corteza hasta que el contenido de humedad es muy similar [31].



Control 0 days



BPD48h 0 days



Control 7 days



BPD48h 7 days



Control 14 days



BPD48h 14 days

Figura 6. Crecimiento de hongos en los panes de control y en el pan suplementado con masa madre fermentada con *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 durante 48 h (BPD48h) durante el almacenamiento a 25 °C.

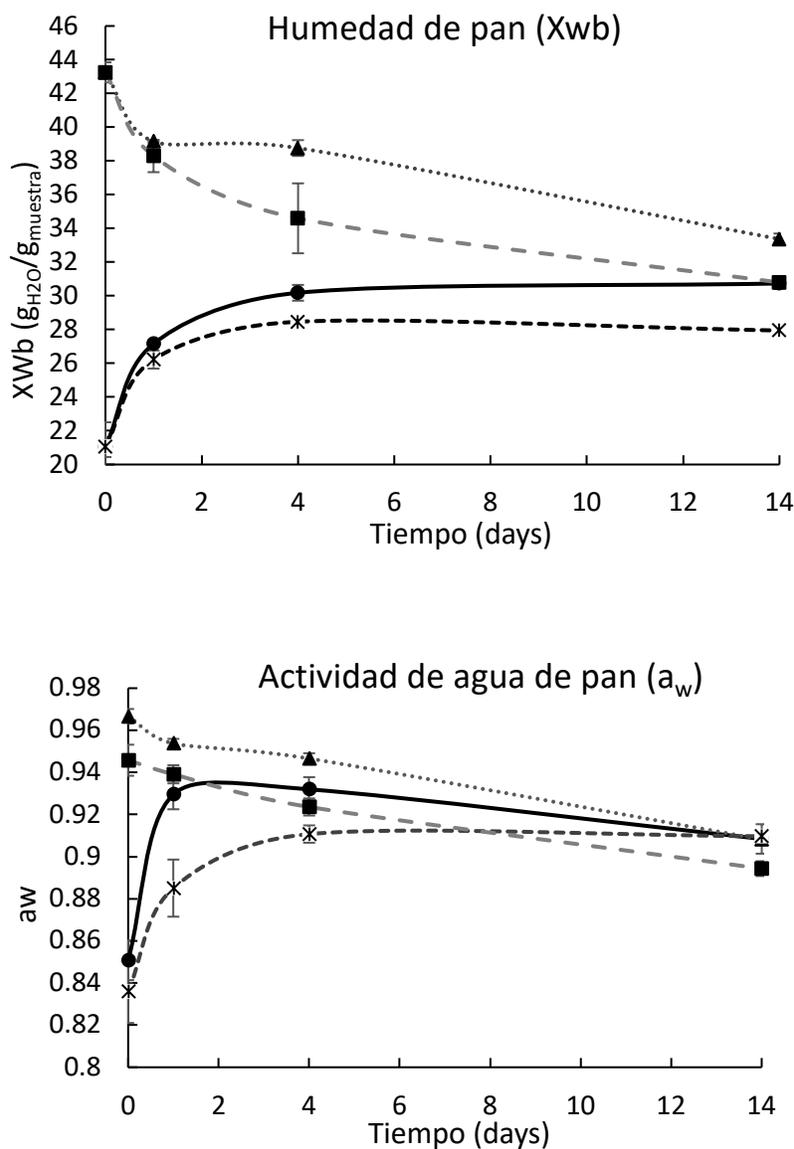


Figura 7. Actividad de humedad y agua (a_w) de la corteza y la miga de pan durante 14 días de almacenamiento a 25 °C. Corteza del control (-●-); miga del control (-▲-); corteza BPD48h (-*-); miga BPD48h (-■-). BPD48h es pan al que se le añade masa madre fermentada con *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 durante 48 h

Este comportamiento se observó para los panes control y PD48h (Figura 7), y la diferencia en el contenido de humedad entre la miga y la corteza de ambos panes fue similar (~3 g H₂O/g de muestra) después de 14 días. Además, los valores de a_w de la miga y la corteza del control y del pan suplementado con BPD48h después de 14 días de almacenamiento fueron similares y oscilaron entre 0.8904 y 0.9097, que fueron

favorables para el crecimiento de hongos (0.88-0.80) [28,32]. Por lo tanto, la restricción del crecimiento de moho en el pan sólo se atribuyó a la masa madre PD48h.

3.1.4 Conclusión

Los extractos acuosos de masa madre tipo *poolish* fermentados con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 presentaron una importante actividad antifúngica contra *Penicillium corylophilum* y *P. chrysogenum*. La actividad antifúngica está relacionada principalmente con los ácidos orgánicos (láctico y acético); sin embargo, también puede estar implicado un compuesto de proteína/polipéptido. Además, la suplementación con masa madre tipo *poolish* fermentada con *L. plantarum* en la formulación del pan aumentó significativamente la vida útil del pan ya que se inhibió el crecimiento de moho. Así, la masa madre tipo *poolish* estudiada podría ser una alternativa antifúngica a los aditivos sintéticos en productos de panadería.

3.1.5 Referencias

1. Gerez, C. L.; Torres, M. J.; Font de Valdez, G.; Rollán, G. Control of Spoilage Fungi by Lactic Acid Bacteria. *Biol. Control* 2013, 64 (3), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.009>.
2. Samapundo, S.; Devlieghere, F.; Vroman, A.; Eeckhout, M. Antifungal Activity of Fermentates and Their Potential to Replace Propionate in Bread. *LWT - Food Sci. Technol.* 2017, 76, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.043>.
3. Siepmann, F. B.; Sousa de Almeida, B.; Waszczynskyj, N.; Spier, M. R. Influence of Temperature and of Starter Culture on Biochemical Characteristics and the Aromatic Compounds Evolution on Type II Sourdough and Wheat Bread. *LWT* 2019, 108, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.065>.
4. De Vuyst, L.; Van Kerrebroeck, S.; Harth, H.; Huys, G.; Daniel, H.-M.; Weckx, S. Microbial Ecology of Sourdough Fermentations: Diverse or Uniform? *Food Microbiol.* 2014, 37, 11–29. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.002>.
5. Lai, H. M.; Lin, T. C. *Bakery Products: Science and Technology*; Wiley Blackwell: Nueva Jersey, 2007. <https://doi.org/10.1002/9780470277553.ch1>.

6. Chavan, R. S.; Chavan, S. R. Sourdough Technology-A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2011, 10 (3), 169–182. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00148.x>.
7. Lavermicocca, P.; Valerio, F.; Evidente, A.; Lazzaroni, S.; Corsetti, A.; Gobbetti, M. Purification and Characterization of Novel Antifungal Compounds from the Sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66 (9), 4084–4090. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4084-4090.2000>.
8. Manini, F.; Casiraghi, M. C.; Poutanen, K.; Brasca, M.; Erba, D.; Plumed-Ferrer, C. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Wheat Bran Sourdough. *LWT - Food Sci. Technol.* 2016, 66, 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.045>.
9. Mani-López, E.; Arrijoja-Bretón, D.; López-Malo, A. The Impacts of Antimicrobial and Antifungal Activity of Cell-free Supernatants from Lactic Acid Bacteria in Vitro and Foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2022, 21 (1), 604–641. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12872>.
10. Axel, C.; Brosnan, B.; Zannini, E.; Furey, A.; Coffey, A.; Arendt, E. K. Antifungal Sourdough Lactic Acid Bacteria as Biopreservation Tool in Quinoa and Rice Bread. *Int. J. Food Microbiol.* 2016, 239, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.006>.
11. Coda, R.; Cassone, A.; Rizzello, C. G.; Nionelli, L.; Cardinali, G.; Gobbetti, M. Antifungal Activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during Sourdough Fermentation: Identification of Novel Compounds and Long-Term Effect during Storage of Wheat Bread. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77 (10), 3484–3492. <https://doi.org/10.1128/AEM.02669-10>.
12. Luz, C.; D’Opazo, V.; Mañes, J.; Meca, G. Antifungal Activity and Shelf Life Extension of Loaf Bread Produced with Sourdough Fermented by *Lactobacillus* Strains. *J. Food Process. Preserv.* 2019, 43 (10). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14126>.
13. Rizzello, C. G.; Cassone, A.; Coda, R.; Gobbetti, M. Antifungal Activity of Sourdough Fermented Wheat Germ Used as an Ingredient for Bread Making. *Food Chem.* 2011, 127 (3), 952–959. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.063>.

14. Zheng, J.; Wittouck, S.; Salvetti, E.; Franz, C. M. A. P.; Harris, H. M. B.; Mattarelli, P.; O'Toole, P. W.; Pot, B.; Vandamme, P.; Walter, J.; Watanabe, K.; Wuyts, S.; Felis, G. E.; Gänzle, M. G.; Lebeer, S. A Taxonomic Note on the Genus *Lactobacillus*: Description of 23 Novel Genera, Emended Description of the Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and Union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70* (4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>.
15. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th ed.; American Association of Cereal Chemists, Ed.; AACC: St. Paul, Minn, 2000.
16. Official Methods of Analysis of AOAC International. Vol. 3, 21st Edition.; Latimer, G. W., AOAC International, Eds.; AOAC International: Gaithersburg, Md, 2019.
17. Arrijoja-Bretón, D.; Mani-López, E.; Palou, E.; López-Malo, A. Antimicrobial Activity and Storage Stability of Cell-Free Supernatants from Lactic Acid Bacteria and Their Applications with Fresh Beef. *Food Control* **2020**, *115* (October 2019), 107286. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107286>.
18. Kosegarten, C. E.; Ramírez-Corona, N.; Mani-López, E.; Palou, E.; López-Malo, A. Description of *Aspergillus flavus* Growth under the Influence of Different Factors (Water Activity, Incubation Temperature, Protein and Fat Concentration, pH, and Cinnamon Essential Oil Concentration) by Kinetic, Probability of Growth, and Time-to-Detection Models. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *240*, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.024>.
19. Settanni, L.; Ventimiglia, G.; Alfonzo, A.; Corona, O.; Miceli, A.; Moschetti, G. An Integrated Technological Approach to the Selection of Lactic Acid Bacteria of Flour Origin for Sourdough Production. *Food Res. Int.* **2013**, *54* (2), 1569–1578. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.017>.
20. Minervini, F.; De Angelis, M.; Di Cagno, R.; Gobbetti, M. Ecological Parameters Influencing Microbial Diversity and Stability of Traditional Sourdough. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *171*, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.021>.
21. Belz, M. C. E.; Axel, C.; Arendt, E. K.; Lynch, K. M.; Brosnan, B.; Sheehan, E. M.; Coffey, A.; Zannini, E. Improvement of Taste and Shelf Life of Yeasted Low-Salt Bread Containing Functional Sourdoughs Using *Lactobacillus amylovorus* DSM

- 19280 and *Weissella cibaria* MG1. *Int. J. Food Microbiol.* 2019, 302 (April), 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.015>.
22. Cizeikiene, D.; Juodeikiene, G.; Paskevicius, A.; Bartkiene, E. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria against Pathogenic and Spoilage Microorganism Isolated from Food and Their Control in Wheat Bread. *Food Control* 2013, 31 (2), 539–545. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.004>.
23. Gerez, C. L.; Torino, M. I.; Rollán, G.; Font de Valdez, G. Prevention of Bread Mould Spoilage by Using Lactic Acid Bacteria with Antifungal Properties. *Food Control* 2009, 20 (2), 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.03.005>.
24. Demirbaş, F.; İspirli, H.; Kurnaz, A. A.; Yilmaz, M. T.; Dertli, E. Antimicrobial and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Sourdoughs. *LWT - Food Sci. Technol.* 2017, 79, 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.067>.
25. Piper, P., Calderon, C. O., & Mollapour, M. (2001). Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology*, 147(10), 2635-2642.
26. Arrijoja-Bretón, D.; Mani-López, E.; Bach, H.; López-Malo, A. Antimicrobial Activity of Protein-Containing Fractions Isolated from *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 Culture. *Braz. J. Microbiol.* 2020, 51 (3), 1289–1296. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00266-5>.
27. Russo, P.; Arena, M. P.; Fiocco, D.; Capozzi, V.; Drider, D.; Spano, G. *Lactobacillus plantarum* with Broad Antifungal Activity: A Promising Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Cereal-Based Products. *Int. J. Food Microbiol.* 2017, 247, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.027>.
28. Dagnas, S.; Gauvry, E.; Onno, B.; Membré, J. M. Quantifying Effect of Lactic, Acetic, and Propionic Acids on Growth of Molds Isolated from Spoiled Bakery Products. *J. Food Prot.* 2015, 78 (9), 1689–1698. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-046>.
29. Gerez, C. L.; Torres, M. J.; Font de Valdez, G.; Rollán, G. Control of Spoilage Fungi by Lactic Acid Bacteria. *Biol. Control* 2013, 64 (3), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.009>.

30. Gänzle, M. G. Lactic Metabolism Revisited: Metabolism of Lactic Acid Bacteria in Food Fermentations and Food Spoilage. *Curr. Opin. Food Sci.* 2015, 2 (Figure 2), 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>.
31. Bárcenas, M. E.; Rosell, C. M. Effect of HPMC Addition on the Microstructure, Quality and Aging of Wheat Bread. *Food Hydrocoll.* 2005, 19 (6), 1037–1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.01.005>.
32. Introduction to Food-Borne Fungi, 4th., rev. ed.; Samson, R. A., Reenen-Hoekstra, E. S. van, Eds.; Centraalbureau voor Schimmelcultures: Baarn, 1995.

3.2 Actividad antifúngica de masa madre (Tipo II) de harina de trigo de dos *Lactobacillus* diferentes *in vitro* y pan

Resumen

Este estudio tiene como objetivo evaluar la capacidad antifúngica y propiedades químicas de los extractos acuosos (EA) obtenidos de la fermentación con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495 o *L. casei* 21/1 de harina de trigo (masa madre tipo *poolish*). La actividad antifúngica de las masas madre tipo *poolish* se probó *in vitro* contra los mohos que deterioran el pan (*Penicillium chrysogenum* y *P. corylophilum*) y en pan. Además, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del pan formulado con masas madre tipo *poolish*. Los EA se obtuvieron separando el sobrenadante del *poolish* al final de la fermentación (24, 48 o 72 h). La adición de *L. acidophilus* o *L. casei* afecta el pH y la acidez titulable (AT) de las masas madre, donde el *poolish* adicionado con *L. casei* presentó un pH más bajo y una acidez más alta. El análisis HPLC identificó principalmente ácido láctico en una concentración entre 1-2% para las masas madre fermentadas con *L. acidophilus*, mientras que para el *poolish* fermentado con *L. casei* se identificaron ácido láctico (1-2%) y ácido acético (0,1-0,2%). Concentraciones entre 25 y 50% de EA disminuyeron la tasa de crecimiento radial de *P. chrysogenum* y *P. corylophilum*; en particular, los EA obtenidos con *L. acidophilus* mostraron un efecto sobre el crecimiento de ambos mohos. El pan añadido con masas madre fermentadas con *Lactobacillus* tuvo un aumento en la vida útil en comparación con el pan sin ellas. Hubo un efecto de la adición de masas madre *poolish* sobre las propiedades fisicoquímicas, de calidad y sensoriales del pan. Pero, incorporar *L. acidophilus* NRRL B-4495 o *L. casei* 21/1 en masas madre tipo *poolish* puede ser una alternativa como agentes antifúngicos naturales, útiles para la industria de la panificación.

3.2.1 Introducción

El pan es un producto alimenticio con una vida útil relativamente corta que se ve afectado principalmente por dos fenómenos; el endurecimiento del pan, donde se producen una serie de reacciones fisicoquímicas que inducen pérdidas de calidad (Bárcenas & Rosell, 2005; Torrieri et al., 2014), y la segunda relacionada con el

crecimiento de hongos en el producto, siendo esta la que genera más pérdidas económicas. Se ha estimado que las pérdidas económicas relacionadas con el crecimiento de moho en productos de panadería pueden representar un 11%, lo que depende de la región y el tipo de producto (García et al., 2019).

Durante muchos años, el propionato de calcio se ha utilizado como agente antifúngico en las hogazas de pan; sin embargo, existe una tendencia actual a reducir el uso de conservadores sintéticos (Samapundo et al., 2017). Una posible solución al deterioro del pan por mohos es utilizar masas madre como parte de la formulación, ya que se ha demostrado que mejora la vida útil del producto (Demirbaş et al., 2017; Hernández-Figueroa et al., 2022; Luz et al., 2019). Las masas madre son masas fermentadas por bacterias ácido lácticas (BAL) y/o levaduras que se utilizan desde hace muchos años como ingrediente que mejora las características sensoriales del pan. Las masas madre se clasifican en cuatro tipos según su proceso de elaboración (Chavan & Chavan, 2011). Los tipos I y IV son masas madre que requieren una fermentación larga (más de cuatro días), y los microorganismos encargados de fermentar estas masas son propios de la harina de trigo. La masa tipo II se inocula intencionalmente con BAL y/o levaduras. Su fermentación dura hasta 3 días, lo que los hace aptos para su uso a gran escala en la industria panadera (Chavan & Chavan, 2011). Se ha demostrado que durante la fermentación láctica de masas madre se producen diversos compuestos como ácidos orgánicos y péptidos con capacidad antimicrobiana (Gerez et al., 2009, 2013; Luz et al., 2017). La literatura informa que los primeros compuestos pueden retardar el crecimiento *in vitro* de mohos típicos del deterioro del pan (Cizeikiene et al., 2013; Gerez et al., 2009, 2013; Rizzello et al., 2011). La capacidad antifúngica de las masas madre producidas por fermentación láctica depende en gran medida del tipo de BAL utilizadas; ya que aquellos compuestos y ácidos producidos, además del ácido láctico, pueden contribuir a la capacidad antifúngica (Mani-López et al., 2022).

De manera similar, se ha observado que la adición de masas madre tipo *poolish* fermentadas con BAL a productos de panadería retarda el crecimiento de moho y mejora su vida útil (Hernández-Figueroa et al., 2022; Luz et al., 2019). Por tanto, este estudio tiene como objetivo evaluar la capacidad antifúngica y las propiedades químicas de los

extractos acuosos (EA) obtenidos de la fermentación de harina de trigo (masa madre tipo *poolish* tipo II) con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495 o *Lactobacillus casei* 21/1 frente al deterioro del pan por mohos y (*Penicillium chrysogenum* y *P. corylophilum*). Se probó la actividad antifúngica de las masas madre *in vitro* y en pan; también se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales.

3.2.2 Materiales y métodos

3.2.2.1 Condiciones de cultivo

Lactobacillus acidophilus NRRL B-4495, *Lactobacillus casei* 21/1, *Penicillium chrysogenum* y *P. corylophilum* se obtuvieron de la colección de cultivos de la Universidad de las Américas Puebla. Las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron en caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS) (Difco™, BD, Sparks, MD, USA) a 35°C durante 48 horas sin agitación y se recolectaron por centrifugación según la metodología reportada por Hernández-Figueroa et al. (2022). Los mohos se cultivaron en agar papa dextrosa (PDA; Bioxon, BD, Estado de México, México) durante 7 días a 25 °C. Según Hernández-Figueroa et al. (2022), la solución de esporas se obtuvo y se ajustó a una concentración de 10⁵ esporas/ml con solución de Tween (0.1%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.).

Este estudio evaluó la actividad antifúngica de tres tipos de preparaciones de masa madre *poolish* tipo II (sobrenadantes libres de células filtrados (CFS), extractos acuosos de masa madre *poolish* pasteurizada y masas madre). El CFS filtrado permitió detectar la actividad antifúngica en medios líquidos (datos no mostrados) y se utilizó para determinar la caracterización química. Se utilizó CFS pasteurizado para evaluar la actividad antifúngica, ya que se requerían grandes volúmenes de CFS para las pruebas y el uso de CFS filtrado no era práctico. Finalmente, debido a las aplicaciones tecnológicas, las masas madre utilizadas directamente en la formulación del pan como ingrediente son factibles y fáciles de manipular.

3.2.2.2 Preparación de extracto acuoso para caracterización fisicoquímica

Las masas madre se prepararon utilizando harina de trigo con alto contenido proteico (11 g/100 g), agua en igual proporción (1:1) y un inóculo de biomasa de cada *Lactobacillus* (1%, p/p). Los ingredientes se mezclaron hasta obtener una masa homogénea y se fermentaron a 35 °C durante 24, 48 o 72 h. Posteriormente, las masas madre se centrifugaron a 7000 × g durante 25 min a 5 °C (Sorvall ST 8R Thermo Fisher Scientific, Osterode am Harz, Alemania) y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de nitrato de celulosa de 0.45 µm (Advantec, MFS, Dublin, CA, EE.UU.) para la obtención de los extractos acuosos (EA). Los EA se almacenaron a -18 °C hasta su análisis.

3.2.2.3 Determinación de pH, acidez titulable, azúcares reductores y ácidos orgánicos

Los extractos acuosos se caracterizaron mediante la determinación del pH, la acidez titulable total y el contenido de azúcares reductores. El pH de la muestra se midió siguiendo el método AACC 02-52 mediante inmersión de electrodos con un medidor de pH precalibrado (HI 2210 Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EE. UU.). La acidez titulable total se determinó mediante el método AACC 02-31 (AACC, 2000) y los azúcares reductores se cuantificaron siguiendo el método 31.036 Lane-Eynon (AOAC, 2019). Las mediciones se realizaron por triplicado.

El análisis y cuantificación de la concentración de ácidos láctico y acético, así como de ácidos propiónico, butírico y piroglutámico, se realizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó un cromatógrafo Agilent 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD) programado para una longitud de onda de 210 nm. De los EA filtrados se tomaron muestras con un muestreador automático Agilent G1329 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) con un volumen de inyección de 20 µL. La separación de compuestos se realizó en una columna Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm) (BIO-RAD, Hercules, CA, EE. UU.) utilizando una solución de tampón fosfato de potasio monobásico (20 mM) (pH 2.4, ajustado con ácido fosfórico). Como fase móvil isocrática a 0.6 ml/min a temperatura ambiente. Se prepararon soluciones estándar a 30-400 mM de ácidos láctico, acético, propiónico, butírico y piroglutámico para cuantificar los ácidos orgánicos

en el extracto acuoso. El área del pico para cada solución se correlacionó con la concentración utilizando un modelo lineal. Para los estándares, los coeficientes de correlación (R^2) fueron >0.99 .

3.2.2.4 Modelado matemático del crecimiento radial del moho

Las masas madre (fermentadas 48 h) se centrifugaron a $7000 \times g$ durante 25 min a 5°C , y el sobrenadante se pasteurizó a 100°C durante 1 min, denominado extracto acuoso de masa madre (PP) pasteurizado tipo *poolish*. Se mezcló PDA fundido estéril con PP en diferentes concentraciones (0, 25 o 50 % v/v). Cada agar-PP se vertió en placas de Petri (60 X 15 mm) y se inoculó con 5 μL de suspensión de esporas ($\approx 10^4$ esporas/placa) en la parte central. Se midieron tres puntos del diámetro de la colonia cada 24 horas hasta que el crecimiento del moho alcanzó el diámetro total de la placa. El crecimiento radial del moho se modeló con la ecuación de Gompertz modificada (Kosegarten et al., 2017) utilizando los datos de evolución del diámetro de la colonia durante la incubación. El modelo permite estimar mediante regresión no lineal, μ (tasa máxima de crecimiento (1/h)), A y λ (la fase de adaptación o tiempo de retraso (h)). Para analizar el ajuste del modelo, se calcularon los residuales y los coeficientes de correlación (R^2) utilizando el software Minitab 20 (Minitab LLC, State College, PA, EE. UU.). Los extractos acuosos de masa madre tipo *poolish* pasteurizados se neutralizaron (NaOH, 45%) hasta alcanzar un pH de 6.5 y se evaluó su actividad antifúngica como se describió anteriormente (sección 2.4).

3.2.2.5 Preparación de pan

Para preparar las muestras se utilizó una formulación estándar de pan blanco; harina de trigo 38%, agua 23%, levadura 1% y 38% masa madre tipo *poolish* formulada con *L. casei* o *L. acidophilus*. Estas masas madre *poolish* se utilizaron directamente después de la fermentación (48 h) sin centrifugar ni pasteurizar. Se usó una mezcladora/amasadora Legacy HL200 (Hobart, Troy, OH, EE. UU.) para mezclar y amasar los ingredientes; luego, la masa se dividió y se formó en trozos (100 g). Primero, las piezas formadas en masa se fermentaron durante 60 minutos a 30°C utilizando un horno Mini combo (Zucchelli Alpha, Trevenzuolo, Verona, Italia). A continuación, el proceso de horneado se realizó a

200 °C durante 18 min en un horno eléctrico Mini combo (Zucchelli Alpha, Trevenzuolo, Verona, Italia). Luego, el pan se enfrió a temperatura ambiente durante 60 min. Paralelamente, se prepararon lotes de pan sin masa madre tipo *poolish* (control) y se acidificaron con ácido láctico (LA) o ácido láctico y acético (LA-AA) en concentraciones similares a las encontradas en los extractos acuosos procedentes de la fermentación con cada uno de los lactobacilos utilizados. Finalmente, los lotes de pan preparados se almacenaron durante 14 días a temperatura ambiente en bolsas de polietileno selladas.

3.2.2.6 Determinación de propiedades fisicoquímicas y de calidad del pan

La medición del pH del pan se realizó con un medidor de pH modelo HI2210 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) siguiendo el método 02-52 de la AACCI (AACCI, 2000). La miga y la corteza de las hogazas de pan se separaron para realizar pruebas de humedad y a_w , y se analizaron individualmente. Para las determinaciones del contenido de humedad se siguió el método AOAC 930.15 (AOAC, 2019). Para el análisis de a_w se utilizó un equipo AquaLab Serie 4TEV (Meter Food, Pullman, WA, EE. UU.). Las mediciones de pH y a_w se llevaron a cabo el día 1 y al final del almacenamiento (cuando era evidente el crecimiento de hongos en el pan). Además, la concentración de ácidos no disociados en las hogazas de pan se calculó utilizando los resultados de los análisis de HPLC (ácido/L de extracto acuoso) considerando el contenido de humedad de las piezas de pan. Los ácidos láctico y acético se consideran ácidos débiles ya que no se disocian completamente en agua, sino que dependen del pH. La forma ácida no disociada es responsable de la actividad antimicrobiana en la fase acuosa del medio. Por lo tanto, la disociación de los ácidos en función del pH medido se calculó utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch ($\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10}([\text{A}^-]/[\text{HA}])$) y el contenido de humedad del pan. Los valores de pKa de LA y AA son 3.86 y 4.75, respectivamente. $[\text{A}^-]$ es la concentración molar de la base conjugada con ácido y $[\text{HA}]$ es la concentración molar del ácido no disociado.

La determinación del volumen se midió por desplazamiento de semillas según el método AACC 10-05 (AACC, 2000), y el volumen específico del pan se expresó como el volumen entre el peso del pan (cm^3/g). Se utilizó un vernier electrónico para medir la

relación ancho/alto, y ambas dimensiones se midieron en rodajas centrales de 2.5 cm de espesor (Lainez et al., 2008). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.2.2.7 Actividad antifúngica en el pan

Las piezas de pan empacadas se observaron diariamente durante 14 días o hasta que se detectó visualmente crecimiento de moho en la superficie para determinar la actividad antifúngica de las masas madre tipo *poolish* y los ácidos láctico o acético en el pan.

3.2.2.8 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como valores medios y desviaciones estándar. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con Análisis de Varianza (ANOVA). Las comparaciones de pares para los valores medios se realizaron con la prueba de Tukey con $p < 0.05$, utilizando el software estadístico Minitab 20 (Minitab LLC, State College, PA, EE. UU.). Antes del análisis estadístico, se evaluó la normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas.

Se evaluaron los efectos de los extractos de diferentes tiempos de fermentación de masa madre tipo *poolish* y tipos de *Lactobacillus* sobre el pH, la acidez, el contenido de azúcares reductores y la concentración de LA y AA. También se analizaron los efectos de la concentración de masa madre y el tipo de lactobacilos sobre la tasa de crecimiento de los mohos. Y los efectos de la formulación del pan (control, control LA, control LA-AA, BPA y BPC) sobre el pH de la masa, el volumen específico del pan, la relación ancho/alto, el pH al principio y al final del almacenamiento, tanto de la miga como de la corteza. También se analizó estadísticamente el contenido de humedad y la actividad del agua al inicio y al final del almacenamiento, así como los resultados de los análisis sensoriales.

3.2.3 Resultados y discusiones

3.2.3.1 pH, acidez titulable y cuantificación de ácidos orgánicos

La Tabla 5 muestra los valores de pH, acidez titulable y la concentración de LA y AA; ninguna de las condiciones probadas produjo ácido propiónico, butírico o piroglutámico. Como se puede observar al aumentar el tiempo de fermentación, el pH del extracto

disminuyó, aumentando en consecuencia la acidez titulable. Ninguno de los extractos de masa madre difiere significativamente en el pH a las 48 o 72 horas ($p > 0.05$). Los valores de pH obtenidos son similares a los reportados por Settanni et al. (2013) y Hernández-Figueroa et al. (2022), quienes reportaron valores de pH entre 3.6 y 3.7 en masas madre fermentadas con *Lactobacillus plantarum* PON 100274 y *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496, respectivamente. Las BAL se clasifican dependiendo de los productos generados durante la fermentación; las BAL homofermentativas producen principalmente ácido láctico a través de la glucólisis, mientras que las BAL heterofermentativas producen ácido láctico, ácido acético y CO₂ y/o etanol (Chavan & Chavan, 2011). El análisis de ácidos orgánicos en los extractos de masa madre mostró que la cepa homofermentativa obligada *L. acidophilus* NRRL B-4495 solo produce LA en una concentración de 88-216 mM, mientras que *L. casei* 21/1 (heterofermentativa facultativa) produjo ambos LA (145-308 mM) y AA (17-65 mM). Gerez et al. (2013) obtuvieron una concentración de LA similar (195 mM) en sobrenadante libre de células (CFS) producido después de 24 horas de fermentación en caldo MRS con *L. acidophilus* CRL 1070.

Asimismo, estos investigadores reportaron concentraciones de LA y AA de 202.9 mM y 16.3 mM al analizar el CFS de *L. casei* CRL 239 después de 24 h de fermentación en caldo MRS. El contenido de LA y AA en los extractos de masas madre fermentadas durante 24 horas (Tabla 1) fue inferior al obtenido por Gerez et al. (2013). Sin embargo, las concentraciones de LA y AA aumentaron para aquellos fermentados a las 48 y 72 horas. Por otro lado, la producción de ácidos orgánicos por las BAL depende de los sustratos disponibles en el medio de crecimiento y las condiciones de crecimiento (Gänzle, 2015). Esto muestra cómo las condiciones de fermentación afectan la producción de ácidos orgánicos en los medios.

3.2.3.2 Inhibición del crecimiento radial

El crecimiento de los mohos se caracterizó por una fase de retraso inicial seguida de un aumento lineal en el diámetro de la colonia (Figura 8). El modelo de Gompertz mostró un ajuste adecuado ($R^2 > 0.98$) a los datos experimentales en los casos evaluados. La duración del tiempo de retraso varió entre 13 y 33 h, dependiendo del tipo de PP. Al

mismo tiempo, la tasa de crecimiento radial del moho se relacionó negativamente con la concentración y el tipo de PP (Tabla 6).

Tabla 5. pH, acidez titulable y ácidos orgánicos de los extractos acuosos de diferentes masas madre fermentadas tipo polish con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495 o *Lactobacillus casei* 21/1.

Extracto de masa madre de Polish	pH	TA (%)	Azúcares reductores (g/100 g muestra)	Ácido láctico (mM)	Ácido acético(mM)	Ácido butírico propiónico y piroglutámico (mM)
MP 24h						
MP 48h						
MA 24h	3.8 ± 0.08 Aa	0.11 ± 0 Ba	1.39 ± 0.042 Ba	88.01 ± 5.92 Bb	ND	ND
MA 48h	3.64 ± 0.02 Ba	0.15 ± 0.01 Ab	2.30 ± 0.17 Aa	214.48 ± 2.66 Ab	ND	ND
MA 72h	3.66 ± 0.04 Ba	0.15 ± 0.01 Aa	2.26 ± 0.21 Aa	216.7 ± 4.07 Ab	ND	ND
MC 24h	3.71 ± 0.01 Aa	0.11 ± 0.01 Ca	1.43 ± 0.03 Ca	145.65 ± 0.77 Ba	17.48 ± 1.75 Ba	ND
MC 48h	3.62 ± 0.01 Ba	0.18 ± 0.01 Ba	2.46 ± 0.02 Ba	304.17 ± 8.87 Aa	66.44 ± 3.5 Aa	ND
MC 72h	3.13 ± 0.02 Bb	0.27 ± 0.01 Ab	2.87 ± 0.13 Ab	308.17 ± 0.77 Aa	65.86 ± 2.67 Aa	ND

*MA: masa madre tipo *polish* fermentada con *L. acidophilus* NRRL B-4495. MC: masa madre tipo *polish* fermentada con *L. casei* 21/1. La acidez titulable se calculó como ácido láctico en porcentaje peso/volumen (% p/v). Diferentes letras mayúsculas muestran una diferencia significativa ($p < 0,05$) en cuanto al tiempo de fermentación. Las letras minúsculas indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a las bacterias ácido lácticas utilizadas para la masa madre tipo *polish*. ND: no detectado.

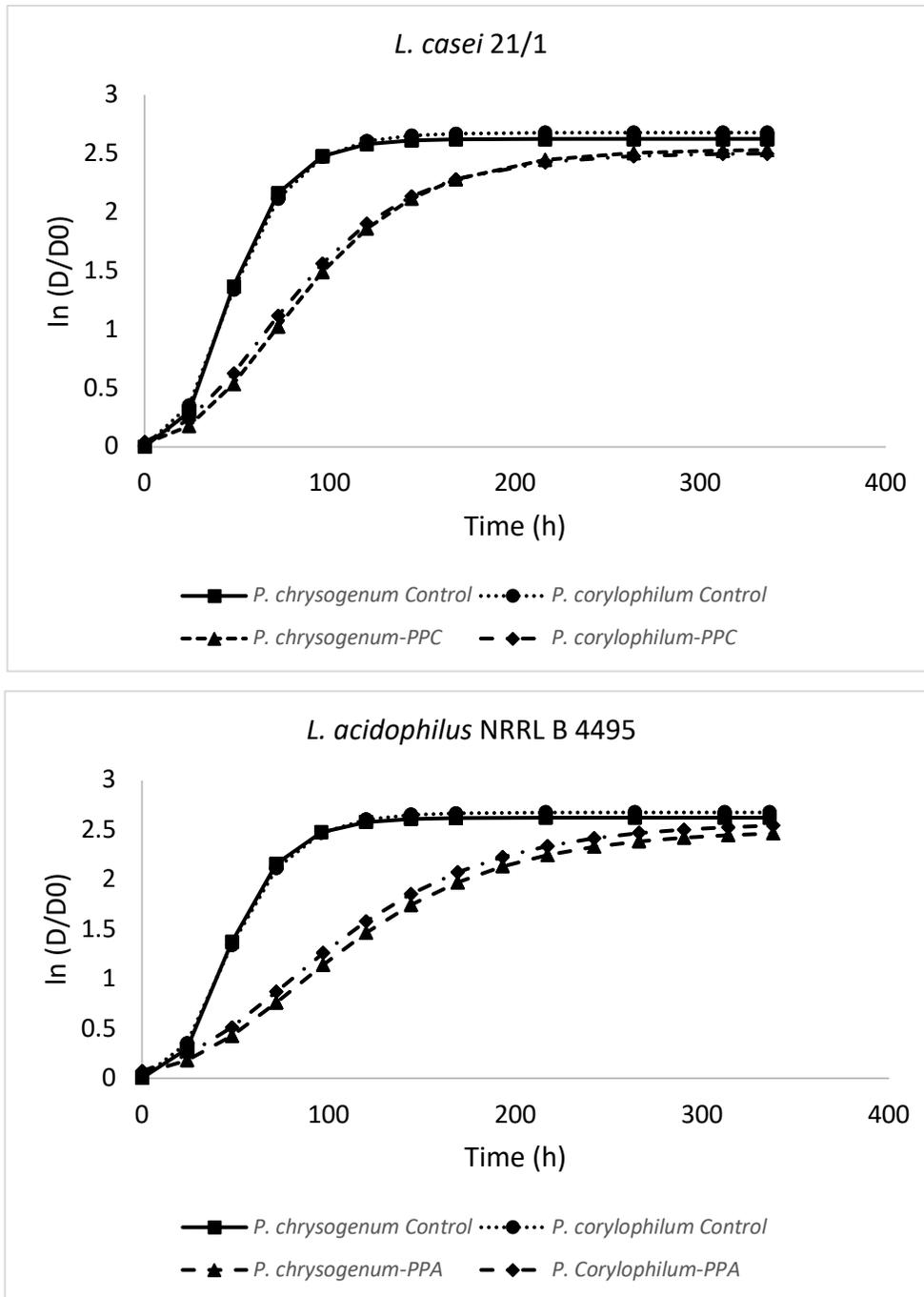


Figura 8. Crecimiento de los mohos y predicción con la ecuación de Gompertz modificada a partir de extractos de masa madre acuosa pasteurizada tipo poolish suplementados al 50%. PPA: extracto acuoso de masa madre tipo poolish pasteurizado suplementado con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495; PPC extracto acuoso pasteurizado de masa madre tipo poolish suplementado con *Lactobacillus casei* 21/1.

Tabla 6. Tasa de crecimiento radial de *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium corylophilum* en el extracto de masa madre poolish (pasteurizado) analizado.

Tipo de <i>poolish</i>	Concentración (%)	Velocidad de crecimiento <i>Penicillium chrysogenum</i> (h ⁻¹)	Velocidad de crecimiento <i>Penicillium corylophilum</i> (h ⁻¹)
PPA	0	0.0715 ± 0.0028 a	0.0804 ± 0.0039 a
	25	0.0216 ± 0.0012 b	0.0207 ± 0.0019 b
	50	0.0153 ± 0.0004 d	0.0157 ± 0.0005 d
PPC	25	0.0229 ± 0.0007 b	0.0227 ± 0.0009 b
	50	0.0209 ± 0.0009 c	0.0201 ± 0.0012 c

PPA: extracto acuoso de masa madre tipo *poolish* pasteurizado suplementado con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495; PPC extracto acuoso pasteurizado de masa madre tipo *poolish* suplementado con *Lactobacillus casei* 21/1. En cada columna, las medias que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

El análisis de varianza mostró que la concentración, el tipo de extracto y su interacción afectan significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento de cada moho. Al comparar las medias (Tabla 6) para ambos mohos, la suplementación con 25% de PP de ambos *Lactobacillus* resultó en tasas medias de crecimiento radial iguales ($p > 0.05$). Sin embargo, la tasa de crecimiento radial promedio para el 50% del PP es significativamente menor ($p < 0.05$) para ambos mohos. La tasa de crecimiento radial se reduce aún más cuando el PP se suplementa con *L. acidophilus* ($p < 0.05$). Aunque *L. acidophilus* alcanza mayores reducciones en la tasa de crecimiento en comparación con *L. casei*; los mohos evaluados no fueron completamente inhibidos; por ello, ambos *Lactobacillus* fueron probados en la siguiente fase de este estudio (la formulación de pan con masas madre).

En general, el PP de *L. acidophilus* afectó la tasa de crecimiento de ambos mohos cuando se usó 25% y 50% de PP y fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) en comparación con el PP suplementado con *L. casei*. En investigaciones anteriores se observó que la adición de 50% de PP suplementado con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 disminuyó la

tasa de crecimiento de *P. chrysogenum* y *P. corylophilum* en un rango de 0.017 – 0.018 h⁻¹ (Hernández-Figueroa et al., 2022). Por tanto, los extractos obtenidos de masas madre tipo *poolish* suplementadas con BAL tienen un efecto fungistático.

Cuando los PP se neutralizan (pH 6.5), su actividad antifúngica se pierde y los mohos probados crecen de manera similar a los controles, lo que indica la naturaleza ácida de los compuestos con actividad antifúngica. Li et al. (2012) determinaron las actividades antifúngicas (contra *Penicillium* sp.) del sobrenadante libre de células (CFS) de *Lactobacillus casei* AST18 (de caldo MRS a 37 °C durante 72 h) a diferentes valores de pH. El valor de pH del CFS se ajustó (2.5 a 10.0) y los autores informaron una actividad antifúngica máxima cuando los valores de pH estaban entre 2.5 y 4.0, disminuyendo rápidamente hasta perderse cuando los valores de pH eran más altos, lo que indica que los ácidos orgánicos eran responsables del efecto antifúngico. El pKa de LA y AA es 3.86 y 4.75, respectivamente, lo que sugiere que dicha pérdida de actividad antifúngica a valores de pH más altos puede atribuirse a la forma no disociada de los ácidos.

3.2.3.3 Propiedades fisicoquímicas y de calidad del pan

La Tabla 7 muestra las propiedades de calidad de las diferentes barras de pan analizadas. El pan suplementado con masas madre tipo *poolish* fermentadas con las diferentes cepas de *Lactobacillus* presentó un menor volumen específico (3.29 y 3.82 cm³/g). En particular, el pan adicionado con *L. casei* 21/1 presentó el menor volumen específico, significativamente diferente ($p < 0.05$) de los demás panes formulados. Por otro lado, el pan control y el control adicionado con ácido láctico (control LA) tienen el mayor volumen específico (4.26 cm³/g) y no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellos. El volumen específico de los panes control y control LA fueron similares a los reportados por Bárcenas & Rosell (2005), quienes evaluaron cómo afecta la incorporación de hidroxipropilmetilcelulosa al volumen específico (4.66 – 5.16 cm³/g). Además, se ha observado que la adición de masas madre al pan disminuye el volumen específico ya que acidifican y modifican la red del gluten (Chavan & Chavan, 2011). Del mismo modo, Sanz-Penella et al. (2012) y Aplevicz et al. (2013) observaron que la adición de masa madre con *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC

27919 y *Lactobacillus paracasei*, respectivamente, disminuyó el volumen específico de las hogazas de pan debido a la reducción del pH.

Tabla 7. Volumen específico y relación ancho/alto de los diferentes panes analizados.

Muestra	Volumen específico (cm ³ /g)	Relación ancho/alto
Control	4.26 ± 0.01 a	1.62 ± 0.01 bc
LA control	4.26 ± 0.22 a	1.69 ± 0.01 b
LA-AA control	3.83 ± 0.10 b	1.59 ± 0.01 c
BPA	3.82 ± 0.12 b	2.05 ± 0.07 a
BPC	3.29 ± 0.12 c	2.03 ± 0.01 a

Control: pan elaborado con la formulación básica. Control LA: pan adicionado con ácido láctico. Pan control LA-AA adicionado con ácidos láctico y acético. BPA: pan suplementado con masa madre tipo *poolish* con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, y BPC: pan adicionado con masa madre tipo *poolish* con *Lactobacillus casei* 21/1. Para cada parámetro evaluado, las letras minúsculas indican una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Además del volumen específico, la relación ancho/alto es un parámetro de calidad importante en los productos de panadería. Las hogazas de pan adicionadas con masa madre tipo *poolish* presentaron los valores más altos de esta relación (2.05 y 2.03); esto significa que las hogazas de pan eran más anchas y menos altas que las del control (Figura 9). Algunos estudios demostraron que el pan de buena calidad tiene una relación ancho/alto de 1.3 – 1.6 (Bárcenas & Rosell, 2005; Haros et al., 2001; Lainez et al., 2008) y está directamente relacionado con la adecuada formación de gluten. Nutter et al. (2019) observaron que el tiempo de fermentación de las BAL en masas madre modifica la microestructura del gluten debido a la despolimerización de las proteínas. Asimismo, observaron que los valores reducidos de pH (3.5-4.0) provocados por las BAL, inducen la activación de las proteasas responsables de la hidrólisis del gluten, formando una estructura con poca capacidad de retener gases, dando como resultado piezas de pan más planas. En el complejo ecosistema microbiano de las masas madre, las levaduras están estrechamente asociadas con las BAL, lo que resulta en interacciones metabólicas entre ambos tipos de microorganismos. Se ha

demostrado que las levaduras liberan nutrientes como aminoácidos y vitaminas que benefician el crecimiento de las BAL.

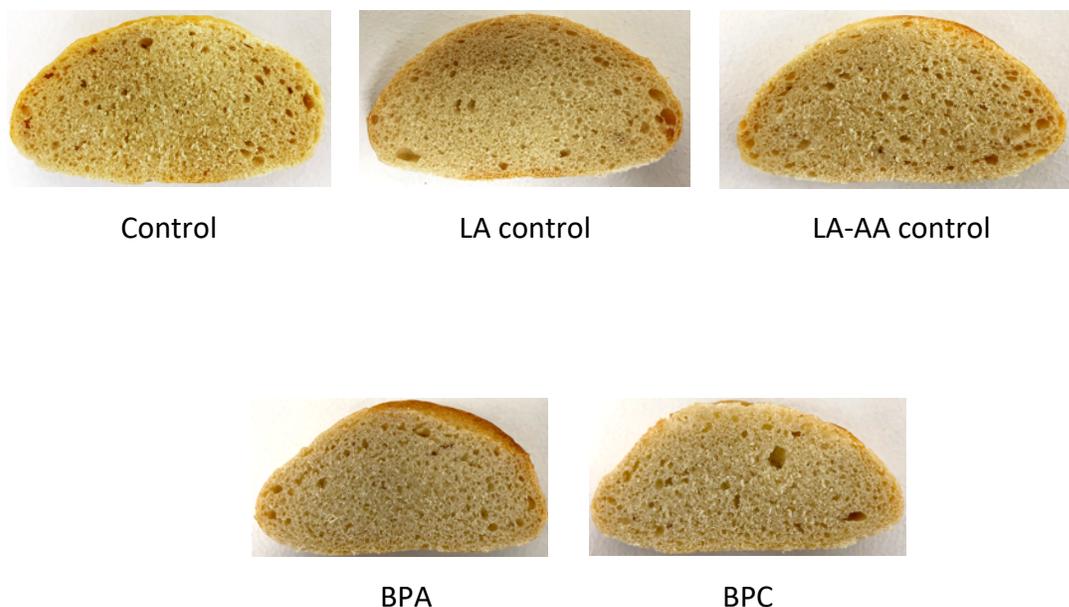


Figura 9. Rebanadas de pan formuladas con distintos ácidos o masas madre tipo poolish. Control: pan elaborado con la formulación básica. Control LA: pan adicionado con ácido láctico. Pan control LA-AA adicionado con ácido láctico y acético. BPA: pan suplementado con masa madre tipo poolish con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, y BPC: pan adicionado con masa madre tipo poolish con *Lactobacillus casei* 21/1.

Los ácidos producidos por las bacterias durante las primeras etapas de la fermentación de la masa madre reducen el pH del medio a cerca de 5, que es óptimo para el crecimiento de la levadura. Sin embargo, las interacciones entre las BAL y la levadura dependen del tipo de bacteria. Las BAL heterofermentativas producen AA debido a su ruta metabólica, y en tiempos de fermentación prolongados, las masas madre alcanzan un pH aproximado de 4 o menos. En este rango de pH, el AA no está disociado y puede atravesar la membrana citoplasmática de levaduras e inhibir o retardar su crecimiento, especialmente *S. cerevisiae* (Minervini et al., 2014)

En la Tabla 8 se muestra que los valores de pH iniciales del pan suplementado con masa madre tipo *poolish* con *L. acidophilus* NRRL B-4495 (BPA) y *L. casei* 21/1 (BPC) fueron 4.3 y 3.7, respectivamente; estos valores están incluidos en el rango de activación de las proteasas del trigo, lo que probablemente provocó los cambios estructurales y de la relación

ancho/alto. De igual forma, al pH medido de las piezas de pan adicionadas con masa madre, el metabolismo de la levadura puede verse afectado, generando panes con menor volumen, más largos y menos altos, especialmente para BPC; *L. casei* 21/1, una BAL heterofermentativa, genera AA, que puede dañar las levaduras como se mencionó anteriormente. Los panes control y control LA presentaron valores de relación ancho/alto similares y no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ellos. El pan control de ácido láctico y ácido acético (LA-AA) tuvo un valor de 1.59, siendo significativamente diferente ($p < 0.05$) del resto de las muestras.

Tabla 8. pH de diferentes panes y masas analizadas al inicio y al final del almacenamiento

Muestra	pH de masa	pH inicial del pan	pH final del pan
Control	5.89 ± 0.03 A	6.10 ± 0.09 Aa	5.97 ± 0.05 Aa
Control LA	4.28 ± 0.04 B	4.63 ± 0.03 Ba	4.64 ± 0.02 Ba
Control LA-AA	3.98 ± 0.08 C	4.49 ± 0.02 Ca	4.50 ± 0.01 Ca
BPA	3.70 ± 0.01 D	4.30 ± 0.03 Da	4.31 ± 0.03 Da
BPC	3.69 ± 0.01 D	3.70 ± 0.02 Ea	3.71 ± 0.03 Ea

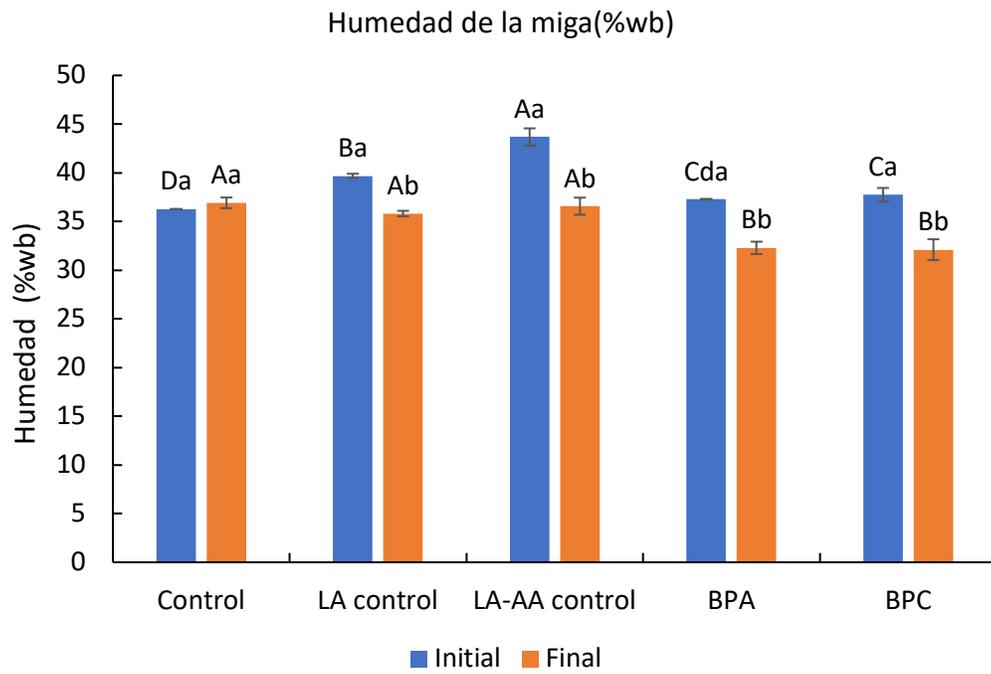
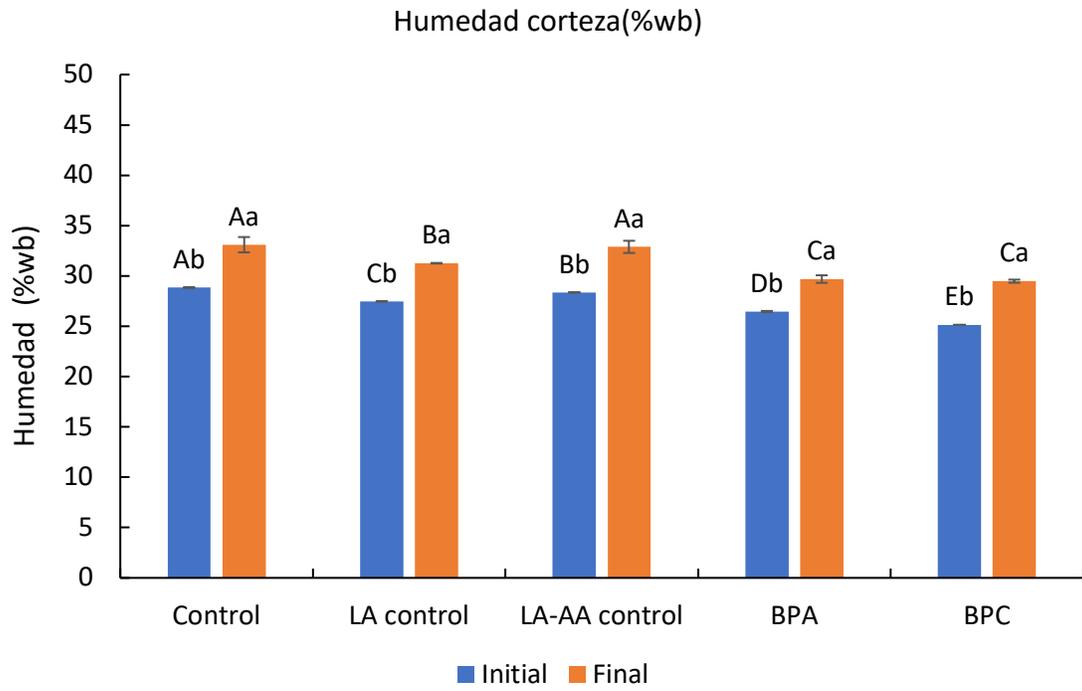
Control: pan elaborado con la formulación básica. Control LA: pan adicionado con ácido láctico. Pan control LA-AA adicionado con ácidos láctico y acético. BPA: pan suplementado con masa madre tipo poolish con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, y BPC: pan adicionado con masa madre tipo poolish con *Lactobacillus casei* 21/1. Diferentes letras mayúsculas muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) en cuanto al tipo de pan. Letras minúsculas diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al pH inicial y final.

En la Tabla 8 se presentan los valores de pH de las diferentes masas y hogazas de pan analizadas al inicio y al final del almacenamiento. El pan control tuvo el valor de pH más alto durante el almacenamiento (6.1 y 5.97). Zhao et al. (2020) informaron valores de pH similares, y Hernández-Figueroa et al. (2022) para hogazas de pan elaboradas únicamente con harina de trigo sin masa madre. Por otro lado, los valores de pH de BPA y BPC (4.30 y 3.70, respectivamente) al inicio del almacenamiento fueron inferiores y significativamente diferentes al resto de las hogazas de pan analizadas ($p < 0.05$). Diversos estudios han observado que la adición de masas madre fermentadas con diferentes cepas de BAL, como

L. plantarum, *Lactobacillus rossiae*, *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus sanfranciscensis* produjeron pan con un pH entre 4.0 y 3.72 (Coda et al., 2011; Hernández- Figueroa et al., 2022; Settanni et al., 2013; Zhao et al., 2020). Esto es consistente con los resultados obtenidos para piezas de pan con BPA y BPC.

Aunque el pH del pan de control LA fue más alto y significativamente diferente del pan BPA, esta diferencia puede estar relacionada con otros compuestos en la masa producidos durante la fermentación. Cuando se agrega más harina a la formulación de BPA, aumenta la disponibilidad de azúcares y, por tanto, disminuye la producción de ácidos orgánicos por *L. acidophilus* y el pH. Por otro lado, la diferencia entre el pH del pan control LA-AA y el pan BPC fue significativamente mayor ($p < 0.05$). Esto probablemente se atribuye a la capacidad heterofermentativa facultativa de *L. casei*, que puede generar ácidos orgánicos adicionales (Chavan & Chavan, 2011).

La Figura 10 muestra el contenido de humedad y la actividad del agua (a_w) de la corteza y la miga de las barras de pan analizadas. Aunque las muestras de las diferentes piezas de pan mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), las muestras de BPA y BPC presentaron menor contenido de humedad tanto en miga como en corteza. Como se mencionó anteriormente, el gluten, así como los gránulos de almidón, son los principales factores que influyen en la retención de humedad en el pan. La formación de una correcta red de gluten y el hinchamiento de los gránulos de almidón reducen la pérdida de vapor de agua durante el horneado del producto (Bárcenas & Rosell, 2005; Corsetti & Settanni, 2007; Gobbetti et al., 1994). Por otro lado, se ha demostrado que las BAL liberan amilasas que disminuyen el pH y activan las proteasas del trigo. En consecuencia, los gránulos de almidón y las redes de gluten se ven afectados, disminuyendo la retención de vapor de agua durante el horneado. Estos cambios estructurales pueden ser responsables de la disminución del contenido de humedad en la corteza y la miga de los panes BPA y BPC (Figura 3).



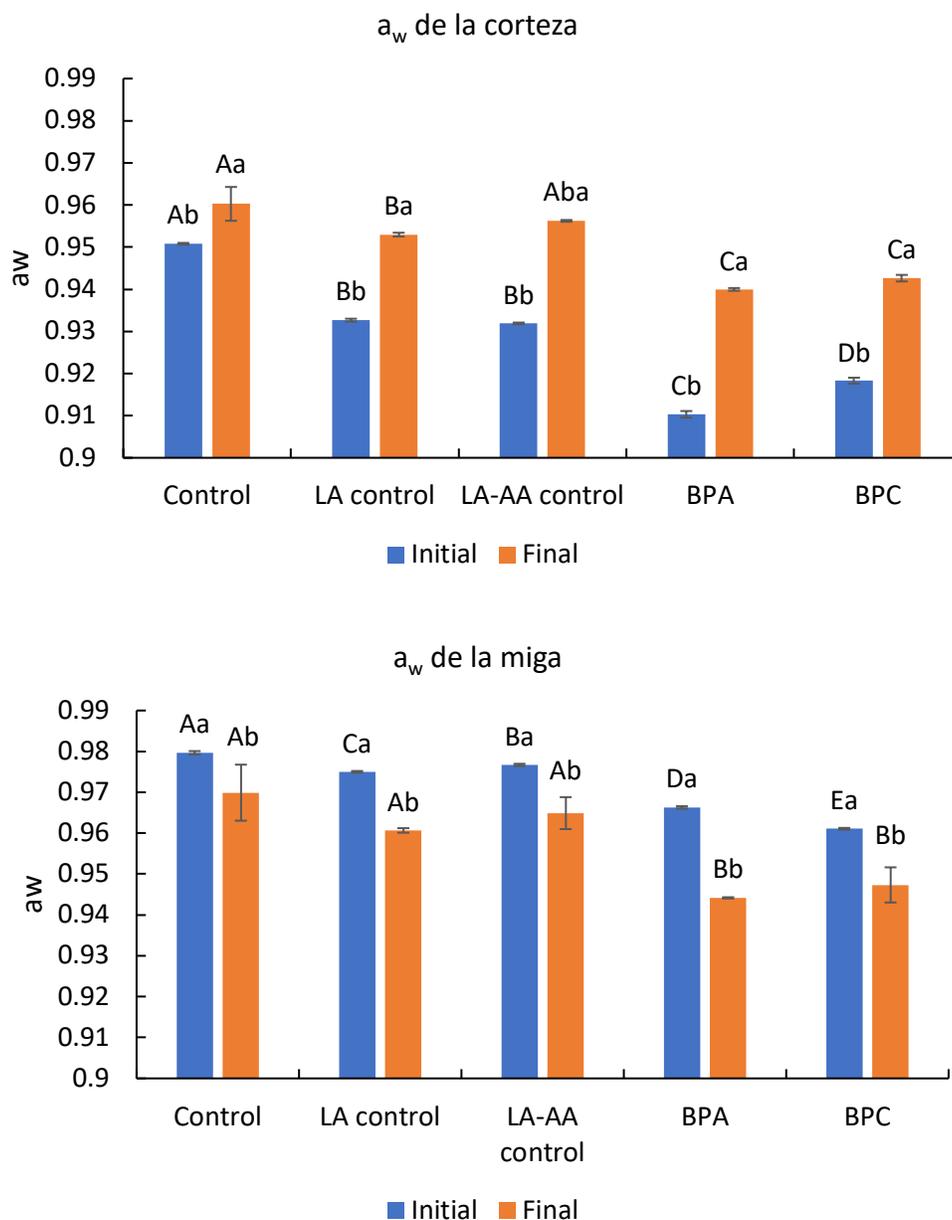


Figura 10. . Contenido de humedad y actividad agua (a_w) de la corteza y miga de los panes en el momento 0 de almacenamiento (inicial) y al final del almacenamiento (final). Control: pan elaborado con la formulación básica. Control LA: pan adicionado con ácido láctico. Pan control LA-AA adicionado con ácido láctico y acético. BPA: pan suplementado con masa madre tipo *polish* con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, y BPC: pan adicionado con masa madre tipo *polish* con *Lactobacillus casei* 21/1. Diferentes letras mayúsculas muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) en cuanto al tipo de pan. Letras minúsculas diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar los valores de tiempo de almacenamiento inicial y final.

Además, durante el almacenamiento de productos de panadería se produce una transferencia de masa ya que el agua de la miga migra hacia la corteza hasta que la humedad es similar entre ambas partes (Bárcenas & Rosell, 2005). Generalmente, este comportamiento se observó para todos los tipos de pan estudiados, como se muestra en la Figura 3. Finalmente, la a_w inicial y final de todos los panes estuvo por encima de 0.90, favorable para el crecimiento de hongos (Dagnas et al., 2015; Samson & Reenen-Hoekstra, 1995).

3.2.3.3 *Análisis sensorial*

Los resultados del análisis sensorial realizado para las hogazas de pan se muestran en la Tabla 9. Para el aroma, los panes control y control LA presentaron las puntuaciones más altas (≈ 7.20), que según la escala hedónica corresponde a “me gusta moderadamente”. Los panes control LA-AA, BPA y BPC tuvieron puntuaciones más bajas para el atributo aroma y no presentaron diferencia significativa entre ellos ($p > 0.05$). En cuanto al color y apariencia de la miga, no hubo diferencia significativa entre las muestras ($p > 0.05$). Las hogazas de pan BPA y BPC fueron más aceptables para los jueces (puntuación > 7.8) que los otros panes. La apariencia de la corteza está relacionada con la reacción de Maillard que ocurre durante el horneado del producto. Como se mencionó anteriormente, las enzimas BAL degradan las moléculas de almidón y maltosa en la harina, produciendo más azúcares reductores que interactúan en la reacción de Maillard (Belz et al., 2019). Finalmente, la aceptabilidad general y el sabor de los panes elaborados con masa madre fueron menores en comparación con el resto de las muestras (4.47 – 4.60), y algunos de los comentarios mencionados por los jueces incluyeron que el pan tenía un sabor ácido, y no estaban familiarizados con este tipo de sabores. Por ello, se realizó otro análisis sensorial con 16 jueces semientrenados a quienes previamente se les entrevistó sobre sus conocimientos sobre el pan de masa madre (Tabla 10).

Tabla 9. Puntajes de la evaluación sensorial de las hogazas de pan (jueces no entrenados)

Atributos	Tipo de pan				
	Control	LA control	LA-AA control	BPA	BPC
Aroma	7.20 ± 1.37 a	7.23 ± 1.33 a	6.60 ± 1.43 ab	5.33 ± 2.47 b	5.87 ± 2.21 b
Color	7.20 ± 1.10 a	7.57 ± 1.04 a	6.77 ± 1.25 a	7.10 ± 1.69 a	7.33 ± 1.65 a
Apariencia de la miga	6.57 ± 1.65 a	7.13 ± 1.33 a	6.73 ± 1.28 a	6.47 ± 2.13 a	6.93 ± 1.87 a
Apariencia de la corteza	6.80 ± 1.54 b	7.37 ± 1.47 ab	7.00 ± 1.53 ab	7.90 ± 1.30 a	7.87 ± 1.14 a
Sabor	6.17 ± 1.86 a	6.97 ± 1.56 a	6.43 ± 1.61 a	4.60 ± 2.84 b	4.47 ± 2.71 b
Aceptabilidad general	6.90 ± 1.37 a	7.23 ± 0.97 a	6.67 ± 1.12 a	5.33 ± 2.41 b	5.30 ± 2.44 b

Para cada atributo, las letras minúsculas indican una diferencia significativa ($p < 0.05$). Control: pan elaborado con la formulación básica. Control LA: pan adicionado con ácido láctico. Pan control LA-AA adicionado con ácidos láctico y acético. BPA: pan suplementado con masa madre tipo *poolish* con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, y BPC: pan adicionado con masa madre tipo *poolish* con *Lactobacillus casei* 21/1.

La evaluación sensorial de los panes realizada por los jueces semientrenados mostró que los panes BPA y BPC sólo presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la apariencia de la corteza, teniendo puntuaciones entre 7.75 y 8.25 que, según la escala hedónica, corresponde a “me gusta moderadamente” – “me gusta mucho”. En cuanto a la aceptabilidad general, las barras de pan adicionadas con masa madre presentaron puntuaciones más altas que las otorgadas por jueces no entrenados. Esto indica la importancia de conocer los sabores ácidos típicos del pan de masa madre.

Tabla 10. Puntajes del análisis sensorial de las hogazas de pan evaluadas realizado con jueces semientrenados.

Atributos	Tipo de pan				
	Control	LA control	LA-AA control	BPA	BPC
Aroma	7.31 ± 1.49 a	7.00 ± 1.41 a	7.00 ± 1.27 a	6.13 ± 2.13 a	6.56 ± 1.41 a
Color	7.19 ± 0.98 a	7.50 ± 1.10 a	7.13 ± 0.89 a	7.00 ± 1.83 a	7.75 ± 1.24 a
Apariencia de la miga	6.63 ± 1.67 a	7.56 ± 1.21 a	7.38 ± 0.96 a	6.56 ± 2.28 a	7.81 ± 1.17 a
Apariencia de la corteza	6.81 ± 1.33 b	7.25 ± 1.48 ab	7.50 ± 1.21 ab	7.75 ± 1.44 ab	8.25 ± 1.00 a
Sabor	6.38 ± 1.63 a	6.88 ± 1.63 a	6.94 ± 1.29 a	6.06 ± 2.35 a	6.25 ± 1.65 a
Aceptabilidad general	6.88 ± 1.46 a	7.25 ± 1.00 a	7.19 ± 0.91 a	6.44 ± 1.97 a	6.75 ± 1.44 a

Para cada atributo, las letras minúsculas indican una diferencia significativa ($p < 0.05$). Control: pan elaborado con la formulación básica. Control LA: pan adicionado con ácido láctico. Pan control LA-AA adicionado con ácidos láctico y acético. BPA: pan suplementado con masa madre tipo *poolish* con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, y BPC: pan adicionado con masa madre tipo *poolish* con *Lactobacillus casei* 21/1.

3.2.3.4 Actividad antifúngica de masa madre tipo *poolish* fermentada con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495 o *Lactobacillus casei* 21/1

El uso de masas madre directamente para formulaciones de masas facilita su uso como ingredientes. Además, numerosos estudios han informado que la actividad antifúngica de la masa madre se correlaciona principalmente con la presencia de LA y AA (Debonne et al., 2020). La Tabla 11 muestra el crecimiento de mohos en las barras de pan durante el almacenamiento a 25 °C. Después de cinco días de almacenamiento, el 50% de las hogazas de pan del control mostraron un crecimiento visible de moho en la corteza del pan (Figura 11). Resultados similares han sido reportados por Hernández-Figueroa et al. (2022) para panes formulados sin masa madre. En el mismo período, solo el 10% de los panes a los que se les añadió ácido láctico (control LA) y ácido láctico-acético (control LA-AA) mostraron

crecimiento de moho en la superficie (Figura 4). Después de 10 días de almacenamiento, el 100% de los panes control, control LA y control LA-AA presentaron crecimiento fúngico. Para el pan al que se le añadió masa madre suplementada con *L. acidophilus* NRRL B-4495, el 90% de los panes mostraron crecimiento de moho en la corteza después de 14 días de almacenamiento. En el caso de los panes con masa madre suplementada con *L. casei* 21/1 después de 14 días de almacenamiento, solo el 10 % de los panes presentaron crecimiento de moho en la superficie (Figura 4).

Tabla 11. Tiempo de falla (crecimiento visible de moho) de los diferentes panes analizados.

Tiempo de almacenamiento (d)	% Pan con crecimiento de moho				
	Control	LA control	LA-AA control	BPA	BPC
0	0	0	0	0	0
5	50	10	10	0	0
7	100	100	40	0	0
10	100	100	100	10	0
12	100	100	100	30	0
14	100	100	100	90	10

Control: pan elaborado con la formulación básica. Control LA: pan adicionado con ácido láctico. Pan control LA-AA adicionado con ácidos láctico y acético. BPA: pan formulado con fermentados tipo *poolish* con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, y BPC: pan adicionado con fermentados tipo *poolish* con *Lactobacillus casei* 21/1.

Como se mencionó anteriormente, la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos se atribuye a su concentración no disociada; así, las cantidades de LA y/o AA se calcularon considerando los valores iniciales de humedad del pan. Para el pan formulado con masa madre de *L. acidophilus*, el LA no disociado fue de 0.57 mmol/100 g de corteza y 0.81 mmol/100 g de miga. La cantidad de LA no disociado en el pan suplementado con masa madre de *L. casei* fue de 1.72 mmol/100 g de corteza y 2.56 mmol/100 g de miga, mientras que para AA fue de 0.58 mmol/100 g de corteza y 0.87 mmol/100 g de miga. Se reportan

pocos datos sobre concentraciones inhibitoras mínimas de LA o AA contra mohos en matrices alimentarias. Por tanto, la comparación es bastante difícil. Guimarães et al. (2018) informaron la concentración inhibitora del 90 % del crecimiento de moho (IC90) para LA y AA en agar. La IC90 para *Penicillium nordicum* MUM 08.16 fue de 64.83 mmol/100 ml y 2.83 mmol/100 ml para LA y AA, respectivamente. Los valores de IC90 reportados son superiores a los obtenidos en este trabajo; sin embargo, la a_w y la matriz alimenticia contribuyen a la inhibición del crecimiento de moho en el pan. Estos resultados demuestran la capacidad de las masas madre tipo *poolish* fermentadas con diferentes cepas de BAL para frenar el crecimiento de hongos en los panes durante el almacenamiento. Resultados similares han sido reportados por Hernández-Figueroa et al. (2022) y Luz et al. (2019), donde masas madre fermentaron con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 y *L. plantarum* CECT749, respectivamente, prolongando la vida útil del pan de 2 a 7 días.



Control 0 días



Control 5 días



LA control 0 días



LA control 7 días



LA-AA control 0 días



LA-AA control 7 días



BPA 0 días



BPA 12 días



BPC 0 días



BPC 14 días

Figura 11. Crecimiento de hongos en las hogazas de pan control, panes adicionados con ácido láctico (control LA), panes adicionados con ácido láctico y acético (control LA-AA), pan suplementado con masa madre fermentada tipo poolish con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495 (BPA) o *Lactobacillus casei* 21/1 (BPC) durante el almacenamiento a 25 °C.

3.2.4 Conclusiones

Los extractos acuosos pasteurizados de masas madre tipo poolish (PP) fermentadas con *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495 o *Lactobacillus casei* 21/1 disminuyeron la tasa de crecimiento radial de *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium corylophilum*. La BAL con mayor actividad antifúngica *in vitro* fue *L. acidophilus*. La disminución de la tasa de crecimiento del moho está relacionada con la presencia de ácidos orgánicos (principalmente láctico y acético). La adición de masas madre tipo poolish suplementadas con las bacterias lácticas estudiadas (como cultivos iniciadores) mejora la vida útil del pan. Debido a la suplementación de las masas madre en el pan, el volumen específico y la relación ancho/alto se vieron afectados, principalmente por los cambios estructurales del gluten generados por la actividad enzimática tanto de las enzimas BAL como de las endoenzimas del trigo, así como por el pH de las masas madre.

El pH de los panes adicionados con masas madre fue menor debido a la presencia de ácidos orgánicos generados durante la fermentación de las BAL. La actividad antifúngica del pan de masa madre se debe principalmente al ambiente ácido creado por las bacterias ácido lácticas y la producción de sustancias antimicrobianas. Estos factores ayudan a inhibir el crecimiento de mohos y contribuyen a una vida útil más larga del pan de masa madre que

el elaborado únicamente con levadura de panadería. Para los jueces no entrenados, la aceptabilidad general del pan con masa madre no fue la deseada. Sin embargo, los jueces semientrenados encontraron que estas hogazas de pan tenían una mejor aceptabilidad general debido a su conocimiento de los sabores ácidos característicos del pan de masa madre. La fermentación de la masa madre tiene un doble papel en la conservación ya que acumula ácidos orgánicos antifúngicos y reduce el pH, aumentando así su actividad antifúngica. Por lo tanto, las masas madre *polish* estudiadas son un posible sustituto de los agentes e ingredientes antifúngicos disponibles comercialmente para las formulaciones de pan.

Agradecimientos

El autor Hernández-Figueroa agradece el apoyo financiero para sus estudios de doctorado en Ciencias de Alimentos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y de la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP).

3.2.5 Referencias

- American Association of Cereal Chemists (Ed.). (2000). *Approved methods of the American Association of Cereal Chemists* (10th ed). AACC.
- Aplevicz, K. S., Ogliari, P. J., & Sant'Anna, E. S. (2013). Influence of fermentation time on characteristics of sourdough bread. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(2), 233-239. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000200005>
- Bárceñas, M. E., & Rosell, C. M. (2005). Effect of HPMC addition on the microstructure, quality and aging of wheat bread. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 1037-1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.01.005>
- Belz, M. C. E., Axel, C., Arendt, E. K., Lynch, K. M., Brosnan, B., Sheehan, E. M., Coffey, A., & Zannini, E. (2019). Improvement of taste and shelf life of yeasted low-salt bread containing functional sourdoughs using *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 and

Weisella cibaria MG1. *International Journal of Food Microbiology*, 302, 69-79.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.015>

Chavan, R. S., & Chavan, S. R. (2011). Sourdough technology-A traditional way for wholesome foods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(3), 169-182. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00148.x>

Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., & Bartkiene, E. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, 31(2), 539-545.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.004>

Coda, R., Cassone, A., Rizzello, C. G., Nionelli, L., Cardinali, G., & Gobbetti, M. (2011). Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: Identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3484-3492. <https://doi.org/10.1128/AEM.02669-10>

Corsetti, A., & Settanni, L. (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40(5), 539-558. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.11.001>

Dagnas, S., Gauvry, E., Onno, B., & Membré, J.-M. (2015). Quantifying effect of lactic, acetic, and propionic acids on growth of molds isolated from spoiled bakery products. *Journal of Food Protection*, 78(9), 1689-1698. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-046>

Debonne, E., Van Schoors, F., Maene, P., Van Bockstaele, F., Vermeir, P., Verwaeren, J., ... & Devlieghere, F. (2020). Comparison of the antifungal effect of undissociated lactic and acetic acid in sourdough bread and in chemically acidified wheat bread. *International Journal of Food Microbiology*, 321, 108551.

Demirbaş, F., İspirli, H., Kurnaz, A. A., Yilmaz, M. T., & Dertli, E. (2017). Antimicrobial and

- functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 361-366. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.067>
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>
- Garcia, M. V., Bernardi, A. O., & Copetti, M. V. (2019). The fungal problem in bread production: Insights of causes, consequences, and control methods. *Current Opinion in Food Science*, 29, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.06.010>
- Gerez, C. L., Torino, M. I., Rollán, G., & Font de Valdez, G. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*, 20(2), 144-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.03.005>
- Gerez, C. L., Torres, M. J., Font de Valdez, G., & Rollán, G. (2013). Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control*, 64(3), 231-237. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.009>
- Gobbetti, M., Corsetti, A., & Rossi, J. (1994). The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: Metabolism of amino acids. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 10(3), 275-279. <https://doi.org/10.1007/BF00414862>
- Guimarães, A., Venancio, A., & Abrunhosa, L. (2018). Antifungal effect of organic acids from lactic acid bacteria on *Penicillium nordicum*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(9), 1803-1818. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1500718>
- Haros, M., Rosell, C. M., & Bénédicto, C. (2001). Use of fungal phytase to improve breadmaking performance of whole wheat bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5450-5454. <https://doi.org/10.1021/jf010642l>

- Hernández-Figueroa, R. H., Mani-López, E., & López-Malo, A. (2022). Antifungal capacity of poolish-type sourdough supplemented with *Lactiplantibacillus plantarum* and its aqueous extracts in vitro and bread. *Antibiotics*, *11*(12), 1813. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121813>
- Kosegarten, C. E., Ramírez-Corona, N., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2017). Description of *Aspergillus flavus* growth under the influence of different factors (water activity, incubation temperature, protein and fat concentration, pH, and cinnamon essential oil concentration) by kinetic, probability of growth, and time-to-detection models. *International Journal of Food Microbiology*, *240*, 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.024>
- Lainez, E., Vergara, F., & Bárcenas, M. E. (2008). Quality and microbial stability of partially baked bread during refrigerated storage. *Journal of Food Engineering*, *89*(4), 414-418. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.05.020>
- Latimer, G. W., & AOAC International (Eds.). (2019). *Official methods of analysis of AOAC International*. Vol. 3 (21st Edition). AOAC International.
- Li, H., Liu, L., Zhang, S., Cui, W., & Lv, J. (2012). Identification of antifungal compounds produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Current Microbiology*, *65*, 156-161.
- Luz, C., D'Opazo, V., Mañes, J., & Meca, G. (2019). Antifungal activity and shelf life extension of loaf bread produced with sourdough fermented by *Lactobacillus* strains. *Journal of Food Processing and Preservation*, *43*(10). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14126>
- Luz, C., Saladino, F., Luciano, F. B., Mañes, J., & Meca, G. (2017). In vitro antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum*. *LWT - Food Science and Technology*, *81*, 128-135. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.053>
- Mani-López, E., Arriola-Bretón, D., & López-Malo, A. (2022). The impacts of antimicrobial

and antifungal activity of cell-free supernatants from lactic acid bacteria in vitro and foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(1), 604-641. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12872>

Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2014). Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 136-146

Nutter, J., Saiz, A. I., & Iurlina, M. O. (2019). Microstructural and conformational changes of gluten proteins in wheat-rye sourdough. *Journal of Cereal Science*, 87, 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.03.006>

Rizzello, C. G., Cassone, A., Coda, R., & Gobbetti, M. (2011). Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chemistry*, 127(3), 952-959. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.063>

Samapundo, S., Devlieghere, F., Vroman, A., & Eeckhout, M. (2017). Antifungal activity of fermentates and their potential to replace propionate in bread. *LWT - Food Science and Technology*, 76, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.043>

Samson, R. A., & Reenen-Hoekstra, E. S. van (Eds.). (1995). *Introduction to food-borne fungi* (4th., rev. ed). Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Sanz-Penella, J. M., Tamayo-Ramos, J. A., & Haros, M. (2012). Application of Bifidobacteria as starter culture in whole wheat sourdough breadmaking. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2370-2380. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0547-1>

Settanni, L., Ventimiglia, G., Alfonzo, A., Corona, O., Miceli, A., & Moschetti, G. (2013). An integrated technological approach to the selection of lactic acid bacteria of flour origin for sourdough production. *Food Research International*, 54(2), 1569-1578. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.017>

Torrieri, E., Pepe, O., Ventorino, V., Masi, P., & Cavella, S. (2014). Effect of sourdough at different concentrations on quality and shelf life of bread. *LWT - Food Science and Technology*, 56(2), 508-516. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.005>

Zhao, Y., Zhang, J., Wei, Y., Ai, L., Ying, D., & Xiao, X. (2020). Improvement of bread quality by adding wheat germ fermented with *Lactobacillus plantarum* dy-1. *Journal of Food Quality*, 2020, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2020/9348951>

3.3 Evaluación de la actividad antifúngica de extractos acuosos y fracciones proteicas de masa madre fermentada por *Lactiplantibacillus plantarum*

Resumen

En la búsqueda de alternativas para conservar los alimentos de forma segura y sostenible, la caracterización de ácidos orgánicos, péptidos y fracciones de proteínas antifúngicas procedentes de fermentaciones de bacterias ácido-lácticas emerge como una estrategia prometedora. Este estudio analiza la capacidad antifúngica de ácidos orgánicos y fracciones proteicas derivadas de masa madre fermentada con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496. Durante la fermentación heterofermentativa de la masa de trigo se formaron principalmente ácido láctico (189.17 mM) y ácido acético (36.78 mM). Se obtuvieron y probaron cuatro fracciones de proteína; la fracción A (PM > 10 kDa) presentó la mayor cantidad de proteína, seguida de la fracción B (PM > 30 kDa). Estas fracciones demostraron una fuerte capacidad antifúngica. Los extractos acuosos y fracciones proteicas inhibieron los hongos evaluados (>90%); su neutralización e hidrólisis provocaron una disminución considerable de la actividad antifúngica, evidenciando la relación directa entre los ácidos orgánicos y las fracciones proteicas. Los compuestos proteicos >30 kDa mostraron una fuerte actividad antifúngica, mientras que las fracciones (PM <30 o <10 kDa) mostraron una actividad débil. Estos hallazgos sugieren que las especies proteicas, así como los ácidos orgánicos derivados de fermentaciones de masa madre con *Lactiplantibacillus plantarum*, podrían ser agentes antifúngicos naturales prometedores para aplicaciones alimentarias, contribuyendo a la reducción de conservadores sintéticos y a la promoción de prácticas sostenibles en la producción de alimentos.

3.3.1 Introducción

Los sistemas alimentarios modernos enfrentan obstáculos importantes, como el desperdicio, el deterioro y la seguridad de los alimentos, entre muchos otros. Las soluciones innovadoras para un sistema alimentario más sólido son una prioridad, mejorando así la sostenibilidad en el sector alimentario. La creciente demanda de alimentos sin conservadores químicos ha llevado a la comunidad científica a desarrollar formas naturales de conservar los alimentos. Por lo tanto, la bioconservación podría considerarse una

alternativa al uso de productos químicos porque potencialmente puede aumentar la seguridad, la vida útil y los valores nutricionales de los alimentos (Bukhari et al., 2020; Luz et al., 2017; Muhialdin et al., 2020; Russo et al., 2017a; Russo et al., 2017b). En los últimos años, han surgido enfoques de conservación naturales, incluido el empleo de bacterias ácido lácticas (BAL) con propiedades antifúngicas (Oliveira et al., 2014; Pawlowska et al., 2012). Las BAL han recibido el estatus GRAS (generalmente reconocido como seguro) y QPS (presunción calificada de seguridad) en los EE. UU. y la UE debido a su larga historia de uso seguro en fermentaciones de alimentos y piensos. Por otro lado, las BAL son una fuente potencial conocida para generar una variedad de metabolitos secundarios, como bacteriocinas, ácidos orgánicos y péptidos antifúngicos (Hernández-Figueroa et al., 2023; Luz et al., 2017; Shehata et al., 2019) producidos por la actividad metabólica y enzimática de las BAL y representan una alternativa natural a los conservadores químicos (Chavan & Chavan, 2011). Diversos estudios han demostrado que los sobrenadantes libres de células (SLC) de fermentaciones de BAL tienen una importante capacidad antifúngica, principalmente debido a los ácidos orgánicos (láctico, acético y fenil láctico) (Cortés-Zavaleta et al., 2014; Gerez et al., 2013; Hernández-Figueroa et al., 2022). También se han identificado en los SFC varios compuestos derivados de proteínas BAL con actividad antifúngica. Muhialdin et al. (2018) informaron que el SLC de cuatro cepas de BAL se sometió a ultrafiltración para purificar los péptidos de bajo peso molecular <10 kDa, y estos péptidos demostraron una fuerte actividad antifúngica contra *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium roqueforti*, *Eurotium rubrum*, *Neurospora sitophila*, y *Rhizopus nigricans*. Coda et al. (2008) informaron resultados similares para el sobrenadante de BAL de *Lactobacillus plantarum* 1A7; estos SLC mostraron una fuerte actividad antifúngica contra *P. roqueforti* después de la ultrafiltración con tres membranas (50, 30 y 10 kDa) en comparación con el sobrenadante no filtrado. Rizzello et al. (2011) obtuvieron resultados similares; estos autores demostraron que los extractos solubles en agua/sal obtenidos de la fermentación de masa madre con *L. plantarum* Lb1 tenían una capacidad antifúngica muy fuerte contra *P. roqueforti*.

La caracterización de péptidos/proteínas antifúngicas para aplicaciones en alimentos producidos por fermentación con BAL desempeña un papel vital en la conservación de los alimentos, la reducción de los conservadores sintéticos, la mejora de la seguridad alimentaria, el desarrollo de alimentos funcionales y la promoción de prácticas de producción de alimentos sostenibles y ecológicas. Por este motivo, este estudio tiene como objetivo analizar la capacidad antifúngica de ácidos orgánicos y fracciones proteicas procedentes de masa madre fermentada con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496.

3.3.2 Materiales y métodos

3.3.2.1 Microorganismos y condiciones de crecimiento

Lactiplantibacillus plantarum NRRL B-4496, *Penicillium chrysogenum* y *P. corylophilum* se obtuvieron de la colección de cultivos del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de las Américas Puebla. La biomasa de *Lactiplantibacillus* se obtuvo mediante centrifugación (7000 x g durante 25 min a 5 °C) según la metodología reportada por (Hernández-Figueroa et al., 2023) utilizando caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS) como medio de crecimiento. El tiempo y temperatura de incubación fueron 48 h y 35 °C. Los mohos se cultivaron en agar papa dextrosa (PDA; Bioxon, BD, Estado de México, México) durante 7 días a 25 °C. Las suspensiones de esporas se obtuvieron según Hernández-Figueroa et al. (2023) y se ajustó a una concentración de $\approx 10^4$ esporas/ml con solución de Tween (0.1%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.).

3.3.2.2 Preparación de extractos acuosos

Las masas madre se prepararon según Hernández-Figueroa et al. (2022; 2023) utilizando harina de trigo (11 g de proteína/100 g) y agua potable en proporciones iguales (1:1). Se añadió 1 g de biomasa de *Lactiplantibacillus plantarum*. Los ingredientes se mezclaron hasta obtener una masa homogénea y se fermentaron a 35 °C durante 48 h. Posteriormente, la masa madre se centrifugó a 7000 x g durante 25 min a 5 °C (Sorvall ST 8R Thermo Fisher Scientific, Osterode am Harz, Alemania), y el sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro de nitrato de celulosa de 0.45 μ m (Advantec, MFS, Dublín, CA, USA) para obtener el extracto acuoso (EA) que se almacenó a -18 °C hasta su uso. Para determinar la actividad antifúngica, los EA se congelaron a -80 °C durante 24 h (ULTF 80, Arctiko, Esbjerg, Dinamarca)

y se liofilizaron a una temperatura de sublimación de 25 °C, una temperatura del condensador de -40 °C y una Pabs = 0.0998 mmHg (Labconco, Modelo 77580, Kansas City, MO, EE. UU.).

Por otro lado, se preparó extracto acuoso de masa madre (PP) pasteurizado tipo *poolish* para evaluar la inhibición del crecimiento radial de los mohos. Después de centrifugar la masa madre de 48 h, el sobrenadante se separó y se pasteurizó a 100 °C durante 1 min.

3.3.2.3 Determinación de pH, acidez titulable y ácidos orgánicos

El extracto acuoso (EA) se caracterizó mediante la determinación del pH y la acidez titulable total (%TTA). El pH se midió siguiendo el método AACC 02-52 mediante inmersión de electrodos con un medidor de pH precalibrado (HI 2210 Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EE. UU.). El %TTA se determinó utilizando el método AACC 02-31 (AACC, 2000) y se expresó como ácido láctico. Las mediciones se realizaron por triplicado.

El análisis y cuantificación de los ácidos orgánicos (acético, láctico, propiónico, butírico y piroglutámico) se realizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), según Hernández-Figueroa et al. (2023). Se utilizó un cromatógrafo Agilent 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD) programado para una longitud de onda de 210 nm. De los EA filtrados se tomaron muestras con un muestreador automático Agilent G1329 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) con un volumen de inyección de 20 µL. La separación de compuestos se realizó en una columna Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm) (BIO-RAD, Hercules, CA, EE. UU.) utilizando una solución buffer de fosfato de potasio monobásico (20 mM) (pH 2.4, ajustado con ácido fosfórico) como fase móvil isocrática a 0.6 ml/min a temperatura ambiente. Se prepararon soluciones estándar de 30 a 400 mM de los ácidos orgánicos para cuantificar estos ácidos en el los EA. El área del pico para cada solución se correlacionó con la concentración utilizando un modelo lineal. Para los estándares, los coeficientes de correlación (R^2) fueron >0.98.

3.3.2.4 Fracciones de proteínas, ensayo de proteínas y electroforesis (SDS-PAGE)

El EA se fraccionó utilizando el método de Muhialdin et al. (2018) con algunas modificaciones. Brevemente, el EA se fraccionó utilizando tubos de ultrafiltración de 15 ml con membrana de celulosa regenerada de 10 kDa (Amicon Ultra-15, Merck Millipore, Burlington, MA, EE. UU.) y se centrifugó a 6000 x g durante 15 minutos. La fracción resultante >10 kDa se fraccionó nuevamente usando tubos de ultrafiltración de 15 ml de membrana de celulosa regenerada de 30 kDa (Amicon Ultra-15, Merck Millipore, Burlington, MA, EE. UU.) y se centrifugó a 6000 x g durante 15 min. Finalmente, se obtuvieron y evaluaron contra los mohos hongos 4 fracciones de proteína (Peso molecular (PM) > 10 kDa; PM < 10 kDa; PM > 30 kDa y PM < 30 kDa). Todas las fracciones de proteínas se liofilizaron (Labconco, Modelo 77580, Kansas City, MO, EE. UU.) para evaluar su actividad antifúngica.

La concentración de proteína en cada fracción se cuantificó mediante el método de ensayo de proteínas Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) utilizando un espectrofotómetro (Multiskan Sky, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) con una longitud de onda de 595 nm y microplacas de 96 pocillos. Según el manual, se preparó una curva estándar de albúmina sérica bovina (2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml) (Bio-Rad Hercules, CA, EE. UU.). Para los estándares, los coeficientes de correlación (R^2) fueron >0.97. Tanto para la curva estándar como para las fracciones de proteínas del extracto acuoso, se empleó un volumen de 5 μ L y se usaron 250 μ L del reactivo colorante (Bio-Rad Hercules, CA, EE. UU.). Las mediciones se realizaron por triplicado.

Las fracciones de proteínas se detectaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Las fracciones de proteína obtenidas se mezclaron con buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 8, EDTA 2 mM, SDS al 5 % (p/v), 2-mercaptoetanol al 0.016 % (p/v) y azul de bromofenol al 0.02 %) en proporción 1: 1, luego se calentó a 100 °C durante 5 min. El volumen de análisis (5-20 μ l) se ajustó para cada fracción para obtener una concentración de \approx 20 μ g de proteína. Luego, cada fracción de proteína se sometió a electroforesis usando gel de funcionamiento reducido (12%) y gel de apilamiento (6%). Se utilizó la escalera de proteínas sin teñir PageRuler (no. de catálogo 26630, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mass., EE. UU.) como marcador de proteínas

estándar. El gel cargado se tiñó con azul de Coomassie R250 (Bio-Rad) y el lavado de la tinción se realizó con una solución de metanol (10%)-acético (10%). Los geles se escanearon utilizando un sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad, EE. UU.) y la densidad y el peso molecular de las bandas en los geles se determinaron utilizando el software Image Lab 4.0 (Bio-Rad, EE. UU.).

3.3.2.5 Inhibición del crecimiento radial de los mohos a partir de extracto acuoso de masa madre pasteurizada tipo polish

El crecimiento radial de los mohos se determinó según Cortés-Zavaleta et al. (2014) con algunas modificaciones. Se mezclaron 9.6 g de extracto acuoso de masa madre (PP) tipo *polish* pasteurizado con 0.15 g de base de agar-agar y se añadió agua hasta completar un volumen de 100 ml. La mezcla se pasteurizó (100 °C durante 1 min) antes de usarse y se vertió en placas de Petri (60 x 15 mm) (10 ml por placa). Paralelamente, se prepararon placas de control con harina de trigo (9.6 g) y agar-agar (0.15 g) en 100 ml. Para cada moho, cada agar-PP o control se inoculó con 5 µL de suspensión de esporas ($\approx 10^4$ esporas/placa) en el centro de la placa. Se midieron tres puntos del diámetro de la colonia después de 5 días de incubación a 25 °C y el porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó de la siguiente manera:

$$\%I = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

Donde A_c es la medida del diámetro medio del control suponiendo un crecimiento circular, y A_t es el diámetro medio de la colonia de moho en el agar de extracto acuoso de masa madre tipo *polish* pasteurizado.

Para conocer la naturaleza de los compuestos con posible capacidad antifúngica, el PP fue neutralizado (pH 6.5 con solución acuosa de NaOH al 35%, p/v) (PP-N) y neutralizado e hidrolizado (PP-NH) con proteinasa K (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) siguiendo el informe de Arrijoja-Bretón et al. (2020). También se evaluó la actividad antifúngica para cada PP (PP-N y PP-NH), como se describe al principio de esta sección. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado

3.3.2.6 Actividad antifúngica del extracto acuoso y sus fracciones proteicas

La actividad antifúngica de las fracciones proteicas se evaluó aplicando un ensayo de difusión en agar según el método descrito por Coda et al. (2011). Se inocularon placas de Petri de PDA (20 ml) (100 x 15 mm) en el centro de la placa con 10 µl de suspensión de esporas ($\approx 10^4$ esporas). Las placas se incubaron a 25 °C hasta que se desarrolló la colonia micelial (≈ 48 h). Luego, se formaron 4 pocillos alrededor de la colonia de moho. Las fracciones de proteína liofilizadas (1 g) se disolvieron en 2 ml de agua esterilizada y se agregaron tres volúmenes diferentes (50, 100 y 200 µl) a cada pocillo (6 mm de diámetro). En el cuarto pocillo se colocaron 200 µL de agua esterilizada como control. Las placas de agar se incubaron durante 48 h a 25 °C. Esta prueba también se aplicó a los EA no fraccionados, a los neutralizados y a los que fueron neutralizados e hidrolizados con proteinasa K.

Las actividades antifúngicas se determinaron midiendo las zonas de inhibición (mm) y la actividad inhibidora se calificó según Rizzello et al. (2011) de la siguiente manera: sin inhibición (0 mm), inhibición muy débil (zona clara de 0.5-1.0 mm); baja inhibición (zona clara de 1.0-2.0 mm); inhibición fuerte (zona clara de 2.0-3.0 mm) e inhibición muy fuerte (zona clara de 3.0-4.0 mm). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.3.2.6 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como valores medios y desviaciones estándar y se analizaron estadísticamente con Análisis de Varianza (ANOVA). Las comparaciones de pares para los valores medios se realizaron con la prueba de Tukey con $p < 0.05$, utilizando el software Minitab 20 (Minitab LLC, State College, PA, EE. UU.). La normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas se evaluaron antes del análisis estadístico. Se analizó estadísticamente el contenido de proteína en las fracciones de proteína obtenidas. También se analizaron estadísticamente los efectos del tipo de extracto acuoso sobre la actividad antifúngica y las diferencias entre los mohos estudiados, así como los efectos del volumen de extracto estudiado o fracciones proteicas sobre la actividad antifúngica para ambos mohos.

3.3.3 Resultados y discusiones

3.3.3.1 Cuantificación de pH, acidez titulable y ácidos orgánicos

La Tabla 12 muestra el valor del pH, la acidez titulable y la concentración de ácidos orgánicos en los extractos acuosos. Como se esperaba, el pH fue inferior a 4 y la acidez titulable fue del 1.4% en promedio. Estas observaciones concuerdan con valores reportados (pH 3.90 - 4.00; TA 1.4 - 1.6%) en diferentes investigaciones en las que se obtienen masas madre fermentadas con diferentes cepas de *L. plantarum* (Hernández-Figueroa et al., 2022; Yin et al., 2015). La disminución del pH y el aumento de TA están directamente relacionados con la formación de ácidos orgánicos por *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 durante la fermentación heterofermentativa de la masa de trigo. Esta investigación observó que se formaron principalmente ácido láctico (189.17 mM) y ácido acético (36.78 mM). Settanni et al. (2013) y Hernández-Figueroa et al. (2022) observaron la formación principalmente de ácido láctico (1.8 – 4 mg/g) y acético (0.15 – 0.80 mg/g) en masas madre fermentadas con *L. plantarum* PON100274 y *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496, respectivamente.

Tabla 12. Composición fisicoquímica de los extractos acuosos de masa madre suplementada con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496

	Extracto acuoso
pH	3.80 ± 0.013
Acidez titulable (%)	1.44 ± 0.011
Ácidos orgánicos (mM)	
Ácido láctico	189.17 ± 2.66
Ácido acético	36.78 ± 1.75
Ácido propiónico	ND
Ácido butírico	ND
Ácido piroglutámico	ND

La acidez titulable se calculó en porcentaje peso/volumen (%p/v) como ácido láctico. ND: No detectado.

3.3.3.2 Contenido de proteínas y electroforesis de fracciones proteicas del extracto acuoso de masa madre

La Tabla 13 muestra el contenido de proteína de cada fracción (mg/ml) obtenido del EA. La fracción A (PM > 10 kDa) presentó la mayor cantidad de proteína (p <0.05), seguida de la

fracción B (PM > 30 kDa). Las fracciones C y D presentaron el menor contenido de proteína (0.22 y 0.05 mg/ml, respectivamente); ambas fracciones no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$). Rizzello et al. (2011) determinaron el contenido de proteína en extractos solubles en agua/sal obtenidos a partir de masa madre fermentada con *L. plantarum* LB1, obteniendo valores de ≈ 6 mg/ml. Estos valores son superiores a los obtenidos en esta investigación; sin embargo, es importante mencionar que Rizzello et al. (2011) obtuvieron la masa madre suplementada con germen de trigo, lo que incrementó el contenido de proteína. Por otro lado, Coda et al. (2011) determinaron un contenido de proteína de aproximadamente 2.4 mg/ml en extractos solubles en agua/sal obtenidos de masa madre fermentada con diversas cepas de *L. plantarum*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta investigación.

Tabla 13. Contenido de proteína para cada fracción proteica de extractos acuosos de masa madre fermentada con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496

Fracción proteica	Contenido de proteína (mg/ml)
A	2.26 \pm 0.20A
B	1.7 \pm 0.19B
C	0.22 \pm 0.02C
D	0.05 \pm 0.01C

Fracción A (PM > 10 kDa); fracción B (PM > 30 kDa); fracción C (PM < 30 kDa) y fracción D (PM < 10 kDa). Diferentes letras mayúsculas muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) en cuanto al tipo de fracción.

La Figura 12 muestra las diferentes bandas de proteínas con pesos moleculares entre 10 y 30 kDa obtenidas de las diferentes fracciones del EA. En general, se puede observar que el tratamiento de neutralización no afectó el peso molecular de los compuestos proteicos de las fracciones (carriles 1-4). Por otro lado, las fracciones A y B presentan bandas proteicas importantes de entre 20 y 30 kDa, que presentan una fuerte capacidad antifúngica (sección 3.4). Esto concuerda con diversas investigaciones en las que se ha observado que las bacterias ácido lácticas (BAL) pueden generar compuestos de naturaleza proteica con

capacidad antimicrobiana. Coda et al. (2008) purificaron compuestos proteicos con capacidad antifúngica formados durante la fermentación de masa madre con *L. brevis* AM7. Entre todas las combinaciones posibles de estos compuestos, la concentración mínima inhibitoria (CMI; aproximadamente 0.95 mg/ml) se encontró para una mezcla de los péptidos DPVAPLQRSGPEIP y PHAVAAVPPVLR. Rizzello et al. (2011) encontraron péptidos bioactivos provenientes de la fermentación de masa madre con *L. plantarum* LB1 con una secuencia de 52 aminoácidos (AAAVFLSLLAVGHCAAADFNATDADADFAGNGVDFNSSDAAVYWG-PWTKAR).

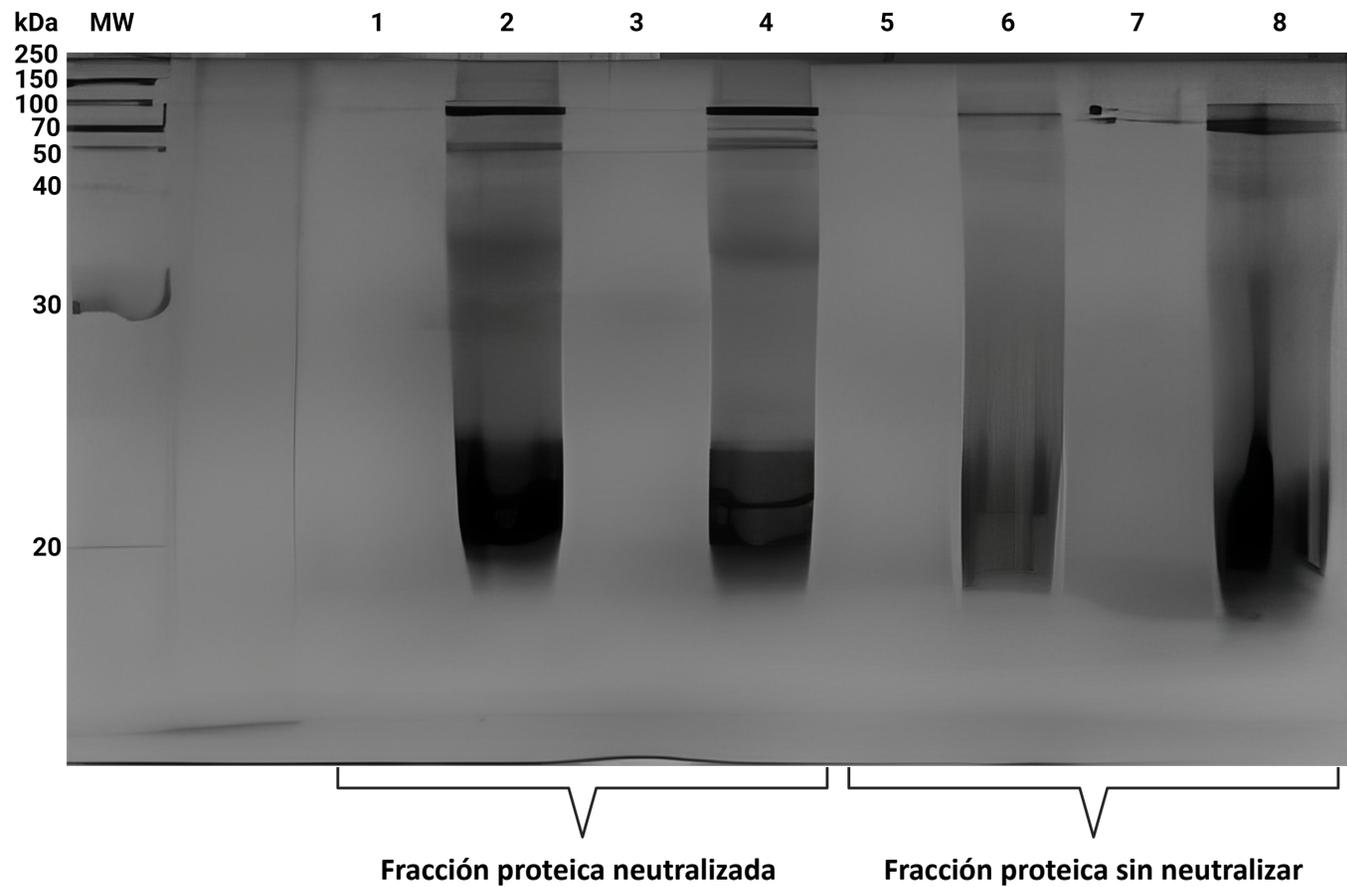


Figura 12. SDS-PAGE de las diferentes fracciones proteicas neutralizadas y fracciones proteicas no tratadas obtenidas a partir de masas madre fermentadas con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496. Carriles: MW, peso molecular; 1, fracción D neutralizada (< 10 kDa); 2, fracción A neutralizada (>10 kDa); 3, fracción C neutralizada (< 30 kDa); 4, fracción B neutralizada (>30 kDa); 5, fracción D (< 10 kDa); 6, fracción A (> 10 kDa); 7, fracción C (< 30 kDa); 8, fracción B (>30 kDa).

3.3.3.3 Inhibición del crecimiento radial a partir de extracto acuoso de masa madre (PP) tipo *poolish* pasteurizado

La Tabla 14 presenta el porcentaje de inhibición para cada moho en agar PP. Como se puede observar, el agar suplementado con PP presentó un porcentaje de inhibición superior al 90% para ambos mohos. Por lo demás, se observa que el proceso de neutralización en los extractos acuosos del PP tuvo un efecto de reducción significativo sobre la actividad antifúngica. El PP-N presentó un porcentaje de inhibición (%) inferior al 10% para *P. chrysogenum* y para *P. corylophilum* inferior al 4%. El extracto acuoso neutralizado e hidrolizado (PP-NH) presentó un porcentaje de inhibición inferior al 1%, lo que indica que la actividad antifúngica está directamente relacionada con los ácidos orgánicos y compuestos proteicos.

Tabla 14. Porcentaje de inhibición de los mohos a partir de extracto acuoso de masa madre (PP) tipo *poolish* pasteurizado nativo, PP neutralizado (PP-N) y PP neutralizado e hidrolizado con proteinasa K (PP-NH)

Agar	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium corylophilum</i>
PP	91.38 ± 0.07Aa	90.98 ± 0.10Ab
PP-N	9.65 ± 1.5Ba	3.25 ± 1.10Bb
PP-NH	0.64 ± 0.61Ca	0.67 ± 0.24Ca

Diferentes letras mayúsculas muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) en cuanto al tipo de agar. Diferentes letras minúsculas indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) en cuanto al tipo de moho.

Diversos estudios han demostrado la capacidad fungistática de ácidos orgánicos como el láctico, acético y fenilacético que provocan una reducción del tamaño de las hifas, retrasan la esporulación de los mohos y, en algunos casos, provocan lesiones en el micelio del moho. (Cortés-Zavaleta et al., 2014; Gerez et al., 2009; Hernández-Figueroa et al., 2023; Mani-López et al., 2022). Además, se ha observado que algunas cepas de BAL pueden generar compuestos peptídicos o especies proteicas con capacidad antimicrobiana (Arrijo-Bretón et al., 2020; Chavan & Chavan, 2011). Cizeikiene et al. (2013) observaron que los sobrenadantes libres de células neutralizados (pH 6.5) obtenidos de la fermentación de caldo MRS con diferentes cepas de BAL (*L. sakei* y *Pediococcus acidilactici*) retrasaron la formación de esporas de diferentes cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* y una fuerte Inhibición

contra *Fusarium culmorum*. De manera similar, Muhialdin et al. (2018) informaron que los sobrenadantes de las cuatro cepas de BAL se sometieron a ultrafiltración para purificar los péptidos de bajo peso molecular <10 kDa, y estos péptidos demostraron una fuerte actividad antifúngica contra *A. niger*, *A. flavus*, *P. roqueforti*, *E. rubrum*, *M. sitophila* y *R. nigricans*. Se han realizado investigaciones sobre la capacidad de inhibición en el crecimiento fúngico que presentan los extractos solubles en agua/sal de masas madre fermentadas con diferentes cepas de *L. plantarum*, demostrando que estos extractos presentan una capacidad de inhibición entre el 20-40% para diversas cepas de *Penicillium* (Coda et al., 2011; Rizzello et al., 2011).

3.3.3.4 Actividad antifúngica del extracto acuoso de masa madre y sus fracciones proteicas

Aumentar el volumen de extracto analizado o fracciones de proteína mejora la actividad antifúngica para ambos mohos (Tabla 15). En general, cuando se neutralizaron los EA y las fracciones, la capacidad antifúngica disminuyó ($p < 0.05$) (Fig. 13). De manera similar, cuando se probaron EA y fracciones neutralizantes e hidrolizadas, la actividad antifúngica se perdió por completo ($p < 0.05$) para ambos mohos. Muhialdin et al. (2018) encontraron que el tratamiento de los sobrenadantes con enzimas proteolíticas resultó en una actividad antifúngica parcialmente disminuida en cuatro aislados de BAL (*Leuconostoc mesenteroides* y tres cepas de *Lactobacillus plantarum*), y esto se atribuyó a la hidrólisis de las proteínas antifúngicas presentes en los sobrenadantes. Según la clasificación propuesta por Rizzello et al. (2011), el EA presentó una fuerte inhibición (2.14 – 3.9 mm) contra ambos mohos cuando se utilizaron 50 o 100 μ L y una inhibición muy fuerte (7.0 – 7.7 mm) cuando se utilizaron 200 μ L. En general, el EA neutralizado (EA-N) presentó una fuerte inhibición (2.20 – 3.00 mm), y sólo 50 μ L del EA-N presentaron una baja actividad (1.59 mm) contra *P. corylophilum*.

En general, las proteínas de la fracción A (PM > 10 kDa) y la fracción B (PM > 30 kDa) presentaron una inhibición muy fuerte contra ambos mohos (Fig. 13-15), y sólo 50 μ L de la fracción B presentaron una ligera inhibición (1.76 mm) contra *P. corylophilum*. Rizzello et al. (2011) observaron que fracciones de extractos solubles en agua/sal con pesos moleculares entre 30 y 50 kDa obtenidos de masas madre fermentadas con *L. plantarum*

LB1 mostraron una fuerte inhibición contra *P. roqueforti*. Las fracciones C (PM < 30 kDa) y D (PM < 10 kDa) presentaron una actividad antifúngica muy débil (0.04-0.89 mm) para ambos mohos. Se ha observado que las BAL tienen la capacidad de generar compuestos peptídicos/proteínicos correspondientes a bacteriocinas tipo III o IV (plantaricina B y plantaricina S) con actividad antifúngica, muchas de ellas tienen pesos moleculares > 30 kDa (Cizeikiene et al., 2013; Coda et al., 2011; Klaenhammer, 1993; Mani-López et al., 2022; Rizzello et al., 2011). Todas las fracciones proteicas neutralizadas e hidrolizadas no presentaron efecto antifúngico. Finalmente, las fracciones proteicas contribuyen a la actividad antifúngica, pero para este tipo de extracto, la presencia de ácidos tiene una influencia importante en la capacidad antifúngica. Esta sinergia de los ácidos orgánicos y las fracciones proteicas bioactivas en la actividad antimicrobiana se ha observado en diferentes investigaciones (Hernández-Figueroa et al., 2022; Mani-López et al., 2022; Nasrollahzadeh et al., 2022). El mecanismo de inhibición de los ácidos orgánicos débiles parece implicar la acidificación del citoplasma y la falla de las fuerzas motrices de los protones, probablemente debido a la diferente solubilidad dentro de la membrana plasmática entre las formas disociadas y no disociadas de tales moléculas (Hernández-Figueroa et al., 2023; Reis et al., 2012). Por lo demás, el modo de acción de las fracciones proteicas de la masa madre sobre los mohos no está del todo aclarado, pero puede depender de muchos factores, como la composición de las fracciones y las condiciones de cultivo, entre muchos otros. Varios autores mencionan que el crecimiento de mohos (incluido *Penicillium*) se inhibe alterando su metabolismo (disminución de la germinación de conidias, inhibición del crecimiento radial), posiblemente alterando la estructura de las membranas celulares (Coda et al., 2011; Li et al., 2021; Liu et al., 2022). Los extractos acuosos obtenidos de masas madre se consideran ingredientes de “etiqueta limpia” y representan una alternativa al uso de agentes antifúngicos sintéticos en productos de panadería. Sin embargo, estas aplicaciones en la industria alimentaria están limitadas principalmente por el bajo rendimiento de producción de péptidos antifúngicos y los altos niveles de concentración mínima inhibitoria (CMI) y el pH y cambios sensoriales que los ácidos orgánicos pueden generar en los productos (They et al., 2019). Una alternativa es la incorporación de masas madre directamente a la

formulación de productos de panadería. Se ha observado que la adición de masa madre mejora la vida útil del pan (Hernández-Figueroa et al., 2023). Sin embargo, se requieren diferentes estudios que se centren en los cambios organolépticos que genera la suplementación con masa madre y cómo esto afecta la aceptabilidad del producto. Por este motivo, el estudio de extractos acuosos como agentes antifúngicos para productos con “etiquetas limpias” es de gran interés para futuras investigaciones en la industria alimentaria.

Tabla 15. Actividad antifúngica (mm) de los extractos acuosos (EA) de masa madre fermentada con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL-B 4496 y sus fracciones proteicas

	<i>Penicillium chrysogenum</i>			<i>Penicillium corylophilum</i>		
	50 µL	100 µL	200 µL	50 µL	100 µL	200 µL
Control	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
EA	3.11 ± 0.12Ac	3.97 ± 0.18Ab	7.77 ± 0.28Aa	2.14 ± 0.17Ac	3.43 ± 0.19Ab	7.03 ± 0.06Ac
EA-N	2.27 ± 0.32Bc	2.90 ± 0.03Bb	3.81 ± 0.23Ba	1.59 ± 0.36Ac	2.29 ± 0.23Bb	3.08 ± 0.07Bc
EA-NH	0 ± 0Ca	0 ± 0Ca	0 ± 0Ca	0 ± 0Ba	0 ± 0Ca	0 ± 0Ca
Fracción A	2.31 ± 0.09Aax	3.22 ± 0.12Bax	7.06 ± 0.11Aax	3.36 ± 0.06Acx	4.84 ± 0.21Abx	6.98 ± 0.47Aax
Fracción B	3.00 ± 1.02Aax	4.19 ± 0.2Aax	5.78 ± 0.42Bax	1.76 ± 0.52Bbx	2.67 ± 0.82Bbx	6.49 ± 0.50Aax
Fracción C	0.12 ± 0.03Bax	0.17 ± 0.07Cax	0.89 ± 0.16Cax	0.05 ± 0.05Cbx	0.17 ± 0.07Cbx	0.44 ± 0.13Bax
Fracción D	0.07 ± 0.05Bax	0.07 ± 0.04Cax	0.13 ± 0.03Dax	0.04 ± 0.02Cbx	0.13 ± 0.02Cax	0.17 ± 0.03Bax
Fracción A-N	0.34 ± 0.11Acy	0.86 ± 0.08Aby	3.47 ± 0.13Aay	0.12 ± 0.03Aby	0.11 ± 0.03Aby	0.15 ± 0.08Aby
Fracción B-N	1.60 ± 0.62Bbxy	1.70 ± 0.78Bby	4.68 ± 0.55Bay	1.19 ± 0.48Bax	1.21 ± 0.3Bay	2.47 ± 0.40Bay
Fracción C-N	0 ± 0Cay	0 ± 0Cay	0 ± 0Cay	0 ± 0Cbx	0 ± 0Cay	0 ± 0Cby
Fracción D-N	0 ± 0Cax	0 ± 0Cax	0 ± 0Cax	0 ± 0Cbx	0 ± 0Cay	0 ± 0Cby
Fracción A-NH	0 ± 0z	0 ± 0z	0 ± 0z	0 ± 0z	0 ± 0y	0 ± 0y
Fracción B-NH	0 ± 0y	0 ± 0z	0 ± 0z	0 ± 0y	0 ± 0y	0 ± 0y
Fracción C-NH	0 ± 0y	0 ± 0y	0 ± 0y	0 ± 0x	0 ± 0y	0 ± 0y
Fracción D-NH	0 ± 0x	0 ± 0x	0 ± 0x	0 ± 0x	0 ± 0y	0 ± 0y

EA: extracto acuoso; extracto acuoso neutralizado de EA-N; y extracto acuoso hidrolizado y neutralizado de EA-NH. Fracción proteica A (PM > 10 kDa); fracción B (PM > 30 kDa); fracción C (PM < 30 kDa) y fracción D (PM < 10 kDa). N fracción proteica neutralizada; Fracción proteica neutralizada e hidrolizada con NH. Diferentes letras mayúsculas muestran una diferencia significativa (p < 0,05) en cuanto al tipo de tratamiento. Diferentes letras minúsculas indican una diferencia significativa (p < 0,05) con respecto al volumen del extracto. x, y y z indican una diferencia significativa (p < 0,05) con respecto al tratamiento de la fracción.

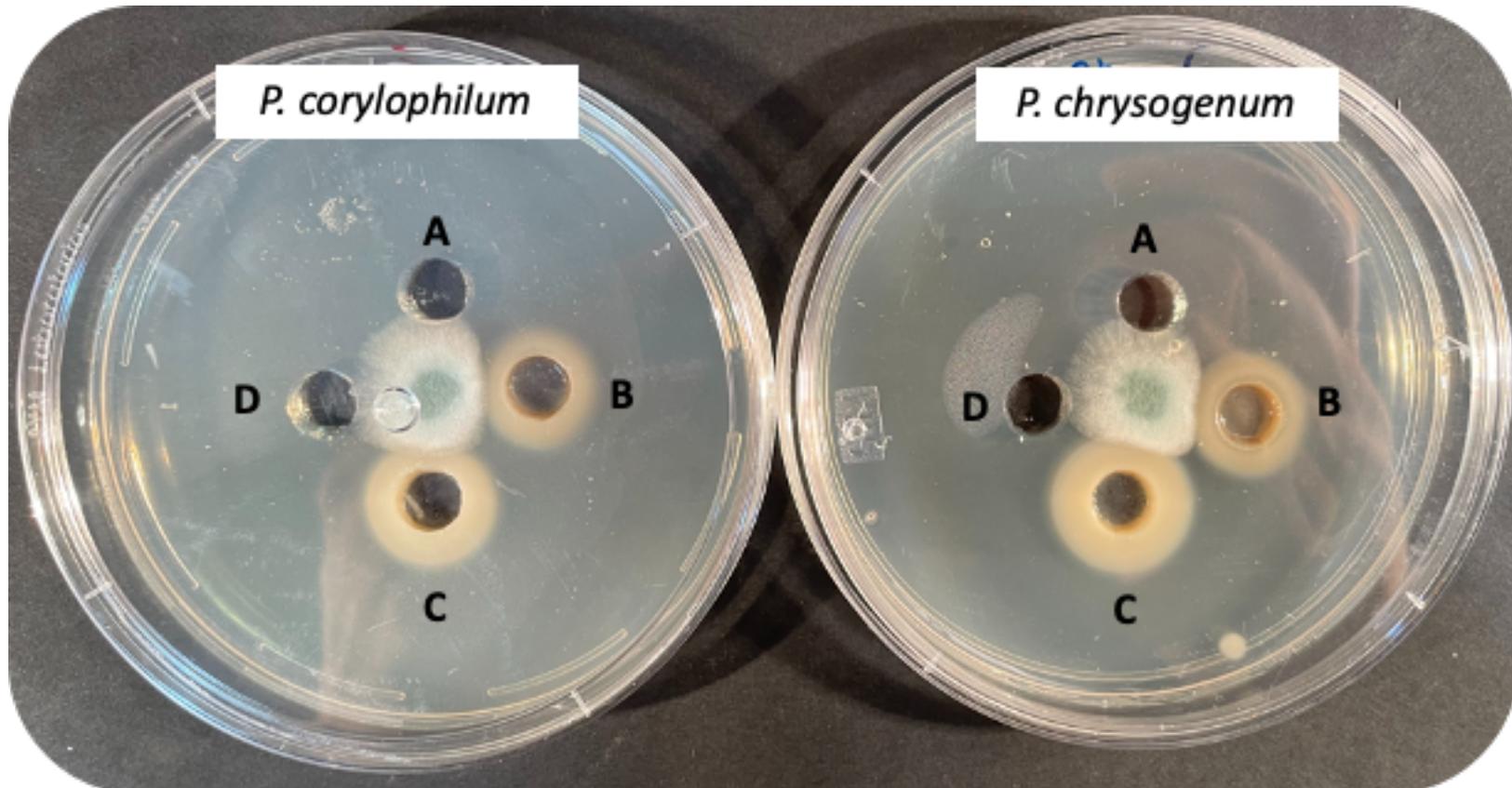


Figura 13. Zonas de inhibición de *Penicillium corylophilum* y *P. chrysogenum* con el extracto acuoso (EA) (200 μ L). A - control (Tween 0.1 %); B - EA neutralizado (EA-N); C - EA nativo y D - EA neutralizado e hidrolizado.

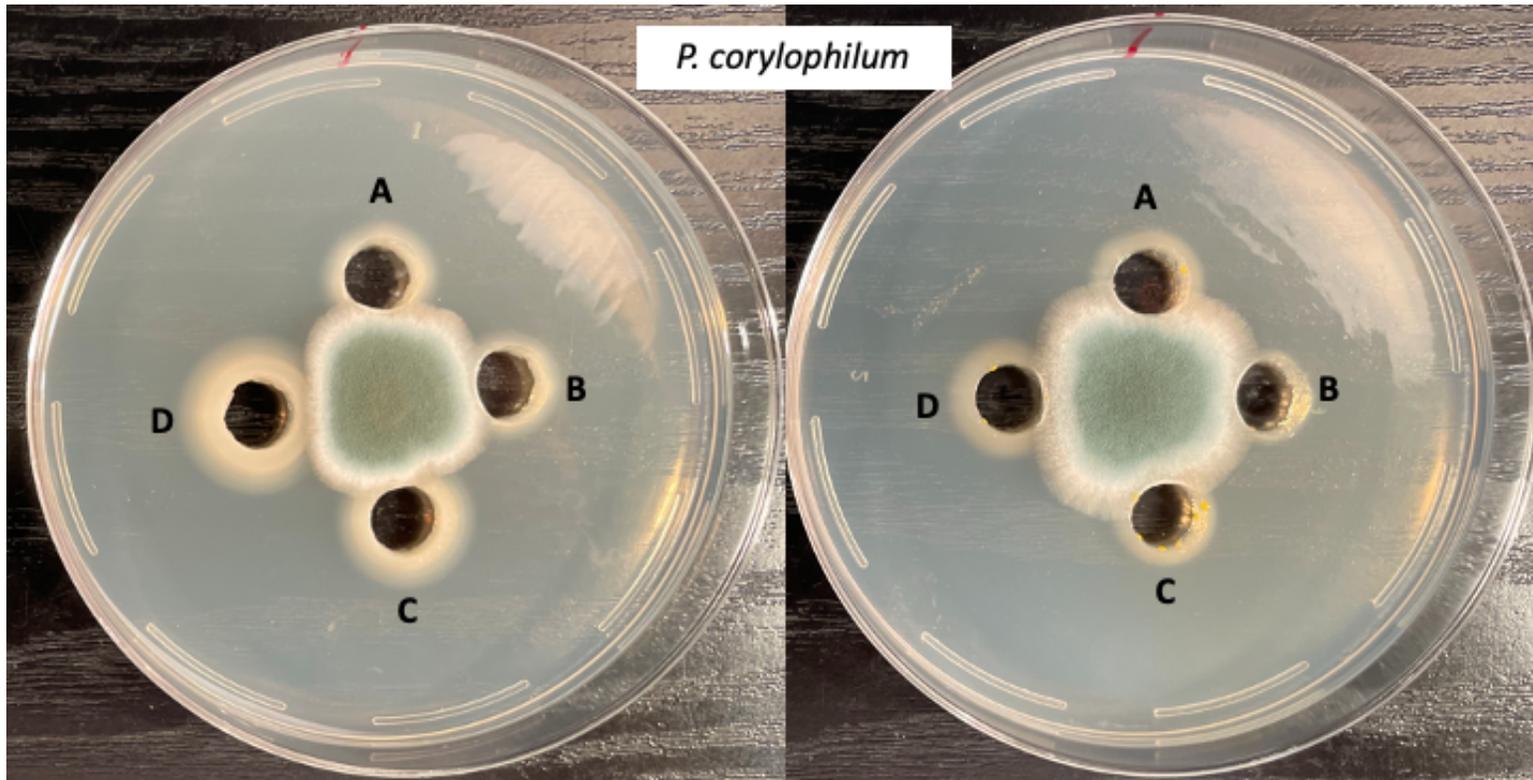


Figura 14. Zonas de inhibición de *Penicillium corylophilum* de las diferentes fracciones proteicas (200 μ L). A) fracción D (PM < 10 kDa); B) fracción C (PM < 30 kDa); C) fracción B (PM > 30 kDa); y D) fracción A (PM > 10 kDa).

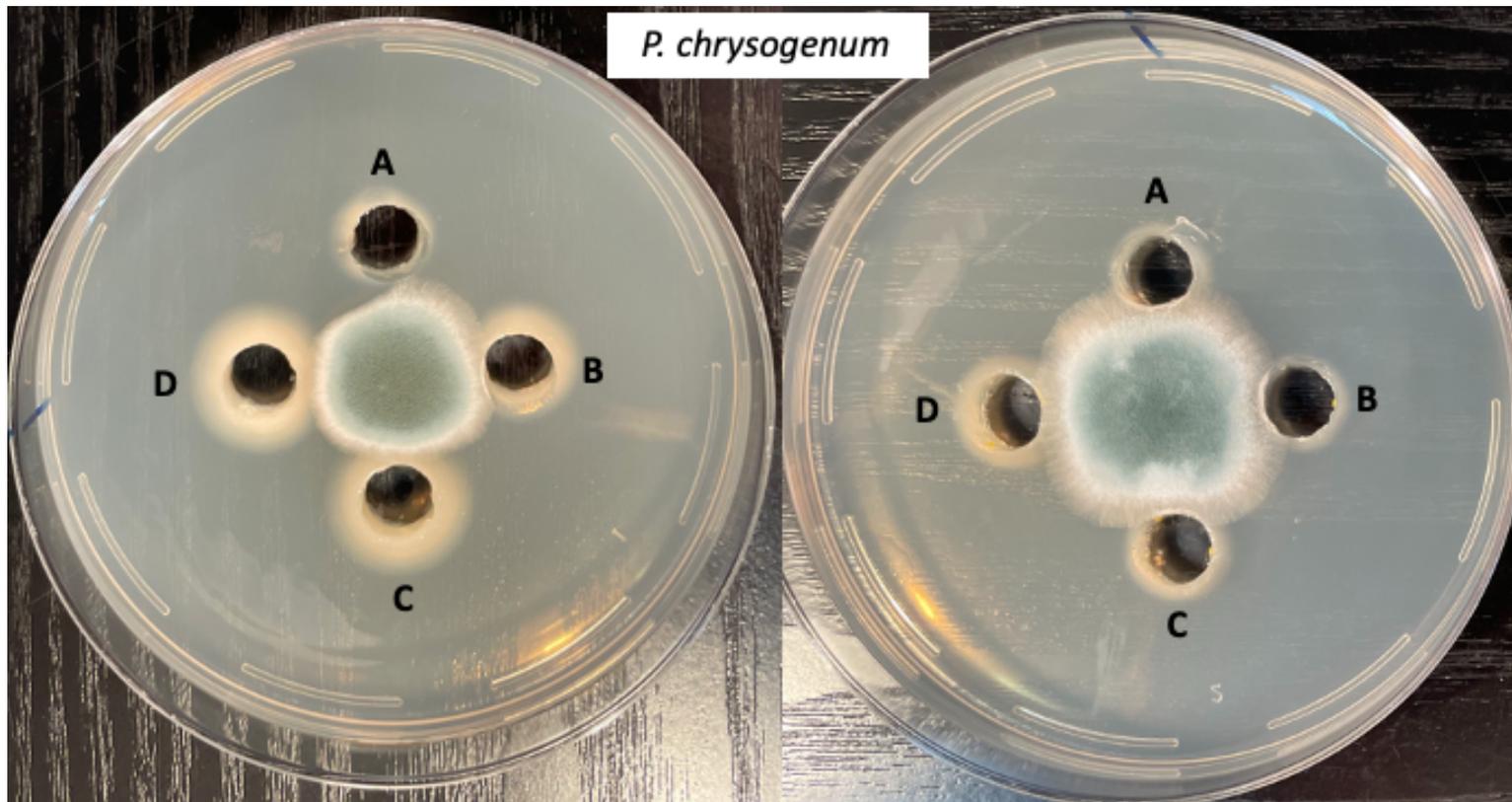


Figura 15. Zonas de inhibición de *Penicillium chrysogenum* de las diferentes fracciones proteicas (200 μ L). A) fracción D (PM < 10 kDa); B) fracción C (PM < 30 kDa); C) fracción B (PM > 30 kDa); y D) fracción A (PM > 10 kDa).

3.3.4 Conclusión

El extracto acuoso y las fracciones proteicas de masa madre fermentadas con *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 presentaron una importante actividad antifúngica contra *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium corylophilum* con una inhibición radial superior al 90%. La fracción proteica (>30 kDa) mostró una fuerte actividad antifúngica, mientras que las fracciones (PM <30 o <10 kDa) mostraron una actividad débil. La actividad antifúngica está relacionada con una sinergia entre los ácidos orgánicos (láctico y acético) y compuestos proteicos formados durante la fermentación de la masa. El uso de masa madre para obtener compuestos antifúngicos a partir de BAL representa una ventaja en costos y seguridad alimentaria frente al uso de medios de cultivo específicos como MRS. El extracto acuoso antifúngico obtenido en este estudio representa una alternativa ecológica a los compuestos conservadores sintéticos para su uso posterior en la industria de la panificación. Sin embargo, los principales desafíos son el rendimiento de producción de compuestos peptídicos, el estudio de técnicas de purificación adecuadas y el proceso de regulación de la seguridad alimentaria por parte de organismos internacionales para su uso como aditivo.

3.3.5 Referencias

- American Association of Cereal Chemists (Ed.). (2000). Approved methods of the American Association of Cereal Chemists (10th ed). AACC.
- Arrijoa-Bretón, D., Mani-López, E., Bach, H., & López-Malo, A. (2020). Antimicrobial activity of protein-containing fractions isolated from *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(3), 1289-1296. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00266-5>
- Bukhari, S. A., Salman, M., Numan, M., Javed, M. R., Zubair, M., & Mustafa, G. (2020). Characterization of antifungal metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus coryniformis* isolated from rice rinsed water. *Molecular Biology Reports*, 47(3), 1871-1881. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05281-1>

- Chavan, R. S., & Chavan, S. R. (2011). Sourdough Technology-A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(3), 169-182. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00148.x>
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., & Bartkiene, E. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, 31(2), 539-545. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.004>
- Coda, R., Cassone, A., Rizzello, C. G., Nionelli, L., Cardinali, G., & Gobbetti, M. (2011). Antifungal Activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during Sourdough Fermentation: Identification of Novel Compounds and Long-Term Effect during Storage of Wheat Bread. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3484-3492. <https://doi.org/10.1128/AEM.02669-10>
- Coda, R., Rizzello, C. G., Nigro, F., De Angelis, M., Arnault, P., & Gobbetti, M. (2008). Long-Term Fungal Inhibitory Activity of Water-Soluble Extracts of *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto and Sourdough Lactic Acid Bacteria during Bread Storage. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23), 7391-7398. <https://doi.org/10.1128/AEM.01420-08>
- Cortés-Zavaleta, O., López-Malo, A., Hernández-Mendoza, A., & García, H. S. (2014). Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *International Journal of Food Microbiology*, 173, 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.016>
- Gerez, C. L., Torino, M. I., Rollán, G., & Font de Valdez, G. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*, 20(2), 144-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.03.005>
- Gerez, C. L., Torres, M. J., Font de Valdez, G., & Rollán, G. (2013). Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control*, 64(3), 231-237.

<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.009>

Hernández-Figueroa, R. H., Mani-López, E., & López-Malo, A. (2022). Antifungal Capacity of Poolish-Type Sourdough Supplemented with *Lactiplantibacillus plantarum* and Its Aqueous Extracts In Vitro and Bread. *Antibiotics*, 11(12), 1813. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121813>

Hernández-Figueroa, R. H., Mani-López, E., & López-Malo, A. (2023). Antifungal activity of wheat-flour sourdough (Type II) from two different Lactobacillus in vitro and bread. *Applied Food Research*, 3(2), 100319. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100319>

Klaenhammer, T. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Microbiology Reviews*, 12.

Li, T., Li, L., Du, F., Sun, L., Shi, J., Long, M., & Chen, Z. (2021). Activity and Mechanism of Action of Antifungal Peptides from Microorganisms: A Review. *Molecules*, 26(11), 3438. <https://doi.org/10.3390/molecules26113438>

Liu, A., Xu, R., Zhang, S., Wang, Y., Hu, B., Ao, X., Li, Q., Li, J., Hu, K., Yang, Y., & Liu, S. (2022). Antifungal Mechanisms and Application of Lactic Acid Bacteria in Bakery Products: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 13, 924398. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.924398>

Luz, C., Saladino, F., Luciano, F. B., Mañes, J., & Meca, G. (2017). In vitro antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum*. *LWT - Food Science and Technology*, 81, 128-135. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.053>

Mani-López, E., Arrijoja-Bretón, D., & López-Malo, A. (2022). The impacts of antimicrobial and antifungal activity of cell-free supernatants from lactic acid bacteria in vitro and foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(1), 604-641. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12872>

- Muhaladin, B. J., Alboory, H. L., Kadum, H., Mohammed, N. K., Saari, N., Hassan, Z., & Meor Hussin, A. S. (2020). Antifungal activity determination for the peptides generated by *Lactobacillus plantarum* TE10 against *Aspergillus flavus* in maize seeds. *Food Control*, 109, 106898. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106898>
- Muhaladin, B. J., Hassan, Z., & Saari, N. (2018a). In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria low molecular peptides against spoilage fungi of bakery products. *Annals of Microbiology*, 68(9), 557-567. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1363-x>
- Muhaladin, B. J., Hassan, Z., & Saari, N. (2018b). In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria low molecular peptides against spoilage fungi of bakery products. *Annals of Microbiology*, 68(9), 557-567. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1363-x>
- Nasrollahzadeh, A., Mokhtari, S., Khomeiri, M., & Saris, P. E. J. (2022). Antifungal Preservation of Food by Lactic Acid Bacteria. *Foods*, 11(3), 395. <https://doi.org/10.3390/foods11030395>
- Oliveira, P. M., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2014). Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. *Food Microbiology*, 37, 78-95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.003>
- Pawlowska, A. M., Zannini, E., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2012). "Green Preservatives": Combating Fungi in the Food and Feed Industry by Applying Antifungal Lactic Acid Bacteria. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 66, pp. 217-238). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394597-6.00005-7>
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., & Penna, A. L. B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124-140. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2>
- Rizzello, C. G., Cassone, A., Coda, R., & Gobbetti, M. (2011). Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chemistry*,

127(3), 952-959. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.063>

Russo, P., Arena, M. P., Fiocco, D., Capozzi, V., Drider, D., & Spano, G. (2017). *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.027>

Russo, P., Fares, C., Longo, A., Spano, G., & Capozzi, V. (2017). *Lactobacillus plantarum* with Broad Antifungal Activity as a Protective Starter Culture for Bread Production. *Foods*, 6(12), 110. <https://doi.org/10.3390/foods6120110>

Settanni, L., Ventimiglia, G., Alfonzo, A., Corona, O., Miceli, A., & Moschetti, G. (2013). An integrated technological approach to the selection of lactic acid bacteria of flour origin for sourdough production. *Food Research International*, 54(2), 1569-1578. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.017>

Shehata, M. G., Badr, A. N., El Sohaimy, S. A., Asker, D., & Awad, T. S. (2019). Characterization of antifungal metabolites produced by novel lactic acid bacterium and their potential application as food biopreservatives. *Annals of Agricultural Sciences*, 64(1), 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2019.05.002>

They, T., Lynch, K. M., & Arendt, E. K. (2019). Natural Antifungal Peptides/Proteins as Model for Novel Food Preservatives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5), 1327-1360. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12480>

Yin, Y., Wang, J., Yang, S., Feng, J., Jia, F., & Zhang, C. (2015). Protein Degradation in Wheat Sourdough Fermentation with *Lactobacillus plantarum* M616. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 7(2), 205-210. <https://doi.org/10.1007/s12539-015-0262-0>

5. Conclusiones y recomendaciones

Los extractos acuosos proveniente de fermentaciones de masas madre tipo *poolish* con diferentes especies de *bacterias ácido-lácticas* presentan una capacidad antifúngica importante contra mohos característicos del deterioro de los productos de panificación.

Los extractos acuosos obtenidos a partir de la fermentación de masas madre con la especie *Lactiplantibacillus plantarum* presentó la mayor capacidad antifúngica contra los mohos estudiados, seguido de los extractos obtenidos con *Lactobacillus acidophilus*.

En general la capacidad antifúngica de los extractos acuosos se debe a la presencia de dos ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético). Por otra parte, se observó la presencia de compuestos de naturaleza proteica en los extractos acuosos de masas madre fermentadas con *Lactiplantibacillus plantarum* que actúan de manera sinérgica con los ácidos orgánicos en contra del crecimiento de los mohos estudiados.

La adición de masas madre tipo *poolish* a la formulación del pan mejoran la vida de anaquel del producto de manera significativa y por esta razón, este tipo de masas podrían ser una alternativa para la obtención de compuestos antifúngicos naturales que sustituyan a los tradicionalmente utilizados en la industria de panificación.

Como recomendaciones para trabajos futuros se pueden evaluar los efectos de mezclas de diferentes cepas de bacterias ácido-lácticas sobre el efecto antifúngico de los extractos acuosos o las masas madre tipo *poolish* tanto en las pruebas *in vitro* como en productos de panificación. Las aplicaciones se podrían ampliar a productos parcialmente horneados ya sea refrigerados o congelados.

Dado los hallazgos obtenidos en esta tesis se recomienda evaluar el efecto de algunos ingredientes que favorezcan la producción de ácidos orgánicos y/o fracciones proteicas al fermentar masas tipo *poolish* con alguna cepa de *Lactobacillus* de la que se tenga información relevante sobre sus metabolitos antimicrobianos y poder ampliar y optimizar el uso de los extractos acuosos y masas madre.

De igual forma, el estudio sobre el efecto de la adición de masas madre o sus extractos sobre las propiedades fisicoquímicas tanto de la masa como en pan es de suma importancia para el desarrollo industrial de las masas madre y su beneficio en la industria de panificación.

5. Evidencias de productos

Se presentan evidencia de los siguientes productos

Hernández-Figueroa, R.H.; Mani-López, E.; López-Malo, A. Antifungal Capacity of Poolish-Type Sourdough Supplemented with *Lactiplantibacillus plantarum* and Its Aqueous Extracts In Vitro and Bread. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1813. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121813>



antibiotics



Article

Antifungal Capacity of Poolish-Type Sourdough Supplemented with *Lactiplantibacillus plantarum* and Its Aqueous Extracts In Vitro and Bread

Ricardo H. Hernández-Figueroa , Emma Mani-López and Aurelio López-Malo *

Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla, San Andrés Cholula 72810, Mexico

* Correspondence: aurelio.lopezm@udlap.mx

Abstract: This study aimed to evaluate the antifungal capacity of the aqueous extracts (AE) of poolish-type sourdoughs fermented with *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496 on broth, agar, and bread. The aqueous extracts were obtained by centrifugation and separating the supernatant from the poolish sourdoughs once the fermentation time had ended. The aqueous extracts inhibited 80% of the growth of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium corylophilum* and <20% of *Aspergillus niger* in broth. The AEs delayed the radial growth rate and increased the lag time for the three molds tested. The addition of poolish-type sourdoughs inhibited fungal growth in bread for ten days. The extracts' fungistatic capacity was primarily attributed to lactic and acetic acids and probably the antifungal peptides occurring in the AE. The *L. plantarum* sourdough is an alternative to calcium propionate as an organic antifungal agent.

Keywords: *Lactiplantibacillus plantarum*; sourdough; antifungal activity; poolish-type



Citation: Hernández-Figueroa, R.H.; Mani-López, E.; López-Malo, A. Antifungal Capacity of Poolish-Type Sourdough Supplemented with *Lactiplantibacillus plantarum* and Its Aqueous Extracts In Vitro and Bread. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1813. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121813>

Academic Editor: Ren-You Gan

Received: 31 October 2022

Accepted: 12 December 2022

Published: 14 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Nowadays, the demand for organic and synthetic additive-free foods has led to the search for natural antimicrobial alternatives. Regarding bakery products, consumers want bread free of synthetic additives. However, bread has a short shelf life due to the growth of molds [1,2]. Sourdoughs result from the fermentation of cereal flour with lactic acid bacteria (LAB) and/or yeast, commonly used as an ingredient in the manufacture of bread [3]. There are different types of sourdoughs, including poolish-type sourdoughs (Type II) which are the result of the inoculation of a flour-water mixture with different types of LAB and the addition or not of *Saccharomyces cerevisiae*. LAB are microorganisms commonly isolated from sourdoughs and are important due to their organic acid production, among other compounds. The fermentation of these sourdoughs occurs at temperatures above room temperature and typically lasts from one to three days [4]. The use of sourdough in manufacturing bakery products is a possible antimicrobial alternative since, for many years, and traditionally, sourdough has been used in bread making for improving organoleptic properties such as flavor, color, and texture.

The process of lactic acid fermentation in sourdoughs depends directly on the type of fermenting microorganism. The LAB isolated in these doughs can be classified according to the glycolytic reactions carried out in the glycolysis metabolic pathway as homofermentative and heterofermentative [5]. Some studies have shown that during the fermentation of sourdoughs, heterofermentative LAB produced lactic acid, acetic acid, ethanol, and CO₂. Moreover, the LAB present in the sourdoughs have proteases, peptidases, and amino acid converting enzymes which break down the proteins of cereals to produce compounds with bioactive properties such as bacteriocins [6]. Different studies have shown that organic acids such as acetic, lactic, and phenyllactic acids have an antimicrobial effect and, in some cases, an antifungal effect [6–8].

Hernández-Figueroa, R. H., Mani-López, E., & López-Malo, A. (2023). Antifungal activity of wheat-flour sourdough (Type II) from two different *Lactobacillus* in vitro and bread. *Applied Food Research*, 3(2), 100319.

Applied Food Research 3 (2023) 100319



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Food Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/afres



Antifungal activity of wheat-flour sourdough (Type II) from two different *Lactobacillus* in vitro and bread

Ricardo H. Hernández-Figueroa, Emma Mani-López, Aurelio López-Malo*

Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla, San Andrés Cholula 72810, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Poolish-type sourdough
Antifungal
Lactic acid bacteria
Bread making
Organic acids

ABSTRACT

This study aims to evaluate the antifungal capacity and chemical properties of the aqueous extracts (AE) obtained from the fermentation with *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495 or *L. casei* 21/1 of wheat flour (poolish-type sourdough). The antifungal activity of poolish-type sourdoughs was tested against bread spoilage molds (*Penicillium chrysogenum*, and *P. corylophilum*) in vitro and bread. In addition, the physicochemical and sensory properties of bread formulated with the poolish-type sourdoughs were assessed. The AEs were obtained by separating the poolish supernatant at the end of fermentation (24, 48, or 72 h). Adding *L. acidophilus* or *L. casei* affects the sourdoughs' pH and titratable acidity (TA), wherein the poolish added with *L. casei* presented a lower pH and higher acidity. HPLC identified mainly lactic acid in a concentration between 1 and 2% for the sourdoughs fermented with *L. acidophilus*, while for the poolish fermented by *L. casei*, lactic acid (1–2%) and acetic acid were identified (0.1–0.2%). Concentrations between 25 and 50% of AEs decreased the radial growth rate of *P. chrysogenum* and *P. corylophilum*; in particular, the AEs obtained with *L. acidophilus* showed an effect on the growth of both molds. Bread added with sourdoughs fermented with *Lactobacillus* had an increase in shelf life compared to bread without them. There was an effect of the addition of poolish sourdoughs on the bread's physicochemical, quality, and sensory properties. But, incorporating *L. acidophilus* NRRL B-4495 or *L. casei* 21/1 into poolish-type sourdoughs can be an alternative as natural antifungal agents, useful for the bakery industry.

1. Introduction

Bread is a food product with a relatively short shelf life that is mainly affected by two phenomena; the staling of bread, where a series of physicochemical reactions occurring induce losses in quality (Bárceñas & Rosell, 2005; Torrieri et al., 2014), and the second related to fungal growth in the product, this being the one that generates the most economic losses. It has been estimated that the economic losses related to mold growth in bakery products can represent 11%, which depends on the region and product type (García et al., 2019).

For many years, calcium propionate has been used as an antifungal agent in loaves of bread; however, there is a current trend in reducing the use of synthetic preservatives (Samapundo et al., 2017). A possible solution to the fungal deterioration of bread is using sourdoughs as part of the formulation, as it has been shown to improve the product's shelf life (Demirbaş et al., 2017; Hernández-Figueroa et al., 2022; Luz et al., 2019). Sourdoughs are fermented dough by lactic acid bacteria (LAB) and/or yeasts that have been used for many years as an ingredient that improves the sensory characteristics of bread. Sourdoughs are classified

into four types depending on their making process (Chavan & Chavan, 2011). Type I and IV are sourdoughs that require long fermentation (more than four days), and the microorganisms responsible for fermenting these doughs are typical of wheat flour. Type II dough is intentionally inoculated with LABs and/or yeasts. Their fermentation takes up to 3 days, making them suitable for large-scale use in the baking industry (Chavan & Chavan, 2011). It has been shown that during the lactic acid fermentation of sourdoughs, various compounds such as organic acids and peptides with antimicrobial capacity are produced (Gerez et al., 2009, 2013; Luz et al., 2017). The literature reports that the former compounds can retard the *in vitro* growth of typical molds of bread spoilage (Cizeikiene et al., 2013; Gerez et al., 2009, 2013; Rizzello et al., 2011). The antifungal capacity of sourdoughs produced by lactic fermentation depends to a large extent on the type of LAB used; since those compounds and acids produced, in addition to lactic acid, can contribute to the antifungal capacity (Mani-López et al., 2022).

Similarly, it has been observed that adding poolish-type sourdoughs fermented with LAB to bakery products retards mold growth and improves their shelf life (Hernández-Figueroa et al., 2022; Luz et al., 2019).

* Corresponding author.

E-mail address: aurelio.lopezm@udlap.mx (A. López-Malo).

<https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100319>

Received 24 March 2023; Received in revised form 8 June 2023; Accepted 10 July 2023

Available online 12 July 2023

2772-5022/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Hernández-Figueroa, R. H., Morales-Camacho, J. I., Mani-López, E., & López-Malo, A. (2024). Assessment of antifungal activity of aqueous extracts and protein fractions from sourdough fermented by *Lactiplantibacillus plantarum*. *Future Foods*, 100314.

Future Foods 9 (2024) 100314



Contents lists available at ScienceDirect

Future Foods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fufo



Assessment of antifungal activity of aqueous extracts and protein fractions from sourdough fermented by *Lactiplantibacillus plantarum*

R.H. Hernández-Figueroa, J.I. Morales-Camacho, E. Mani-López, A. López-Malo*

Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla, Sta. Catarina Mártir s/n. San Andrés Cholula, Puebla 72810, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Lactiplantibacillus plantarum
Sourdough
Antifungals
Protein fractions
Organic acids

ABSTRACT

In the search for sustainable alternatives to preserve food safety, the characterization of organic acids, peptides, and antifungal protein fractions from lactic acid bacteria fermentations emerges as a promising strategy. This study analyzes the antifungal capacity of organic acids and protein fractions derived from sourdough fermented with *Lactiplantibacillus plantarum* NRRL B-4496. During the heterofermentative fermentation of the wheat dough, lactic acid (189.17 mM) and acetic acid (36.78 mM) were mainly formed. Four protein fractions were obtained and tested; fraction A (MW > 10 kDa) presented the highest amount of protein, followed by fraction B (MW > 30 kDa). These fractions demonstrated strong antifungal capacity. Aqueous extracts and protein fractions inhibited the evaluated fungi (>90 %); their neutralization and hydrolysis caused a considerable decrease in antifungal activity, evidencing the direct relationship between organic acids and protein fractions. Proteinaceous compounds >30 kDa showed strong antifungal activity, while fractions (MW < 30 or < 10 kDa) showed weak activity. These findings suggest that protein species, as well as organic acids derived from sourdough fermentations with *Lactiplantibacillus plantarum*, could be promising natural antifungal agents for food applications, contributing to the reduction of synthetic preservatives and the promotion of sustainable practices in food production.

Introduction

Modern food systems face significant hurdles such as food waste, spoilage, and security, among many others. Innovative solutions for a more robust food system are a priority, enhancing sustainability in the food sector. The growing demand for reducing the addition of chemical preservatives has led the scientific community to develop natural ways of preserving food. Therefore, bio-preservation could be considered an alternative that can potentially increase foodstuffs' safety, shelf-life, and nutritional values (Bukhari et al., 2020; Luz et al., 2017; Muhialdin et al., 2020; Russo et al., 2017a, 2017b). In recent years, eco-friendly preservative approaches have emerged, including employing lactic acid bacteria (LAB) with antifungal properties (Oliveira et al., 2014; Pawlowska et al., 2012). LABs have received GRAS (Generally Recognized As Safe) and QPS (Qualified Presumption of Safety) status in the US and EU due to their long history of safe use in food and feed fermentations. LABs are a potential source for generating a variety of secondary metabolites, such as bacteriocins, organic acids, and antifungal peptides (Hernández-Figueroa et al., 2023; Luz et al., 2017; Shehata et al., 2019) produced by their metabolic and enzymatic

activity, being a natural alternative to chemical preservatives (Chavan and Chavan, 2011).

Various studies have shown that cell-free supernatants (CFS) from LAB fermentations have significant antifungal capacity, primarily due to organic acids (lactic, acetic, and phenyllactic) (Cortés-Zavaleta et al., 2014; Gerez et al., 2013; Hernández-Figueroa et al., 2022). Also, various LAB-protein-derived compounds with antifungal activity have been identified in CFS. Muhialdin et al. (2018) reported that CFS from four LAB strains, purified by ultra-filtration to get low molecular peptides < 10 kDa, demonstrated strong antifungal activity against *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium roqueforti*, *Eurotium rubrum*, *Neurospora sitophila*, and *Rhizopus nigricans*. Coda et al. (2008) reported similar results for LAB supernatant from *Lactobacillus plantarum* 1A7; these CFS showed strong antifungal activity towards *P. roqueforti* after ultra-filtration with three membranes (50, 30, and 10 kDa) compared with non-filtrated CFS. Rizzello et al. (2011) demonstrated that water/salt-soluble extracts from sourdough fermentation with *L. plantarum* Lb1 had a strong antifungal capacity against *P. roqueforti*.

Characterizing antifungal peptides/proteins in foods fermented with LAB allows for accurately identifying sustainable and eco-friendly

* Corresponding autor.

E-mail address: aurelio.lopezm@udlap.mx (A. López-Malo).

<https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100314>

Received 24 August 2023; Received in revised form 29 November 2023; Accepted 3 February 2024

Available online 5 February 2024

2666-8335/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Figuerola, R. H. H., López-Malo, A., & Mani-López, E. (2024). Antimicrobial activity and applications of fermentates from lactic acid bacteria—a review. *Sustainable Food Technology*.



Cite this: DOI: 10.1039/d3fb00241a

Antimicrobial activity and applications of fermentates from lactic acid bacteria – a review

Ricardo H. Hernández Figuerola, Aurelio López-Malo and Emma Mani-López*

Fermentates are complex mixtures containing inactivated or viable lactic acid bacteria (LAB) cells, growth metabolites, and culture medium compatible with different food applications, offering a cost-effective and practical alternative to LAB cell-free supernatants (CFS). Contrariwise to CFS, in fermentates, the bacteria in the growth medium are commonly inactivated to be used directly. Despite their commercial availability in the food industry, limited research has explored their antimicrobial potential. This review summarises the current knowledge regarding the antimicrobial activity of fermentates, both *in vitro* and in food applications. Furthermore, the paper discusses fermentates' physicochemical and sensory effects in foods. Studies indicate that commercial fermentates, applied at low concentrations (<2%), laboratory-produced fermentates at 10%, and sourdoughs at 20–30%, demonstrate effective antimicrobial properties. Notably, the reviewed literature suggests that fermentates minimally impact food products' physicochemical and sensory attributes. The antimicrobial activity of fermentates and their potential to replace chemical preservatives, together with their practical and cost-effective nature, contribute positively to sustainability in food production by reducing dependence on selective media and improving the quality of final products and their applicability in diverse food industries.

Received 15th December 2023
Accepted 4th January 2024

DOI: 10.1039/d3fb00241a

rsc.li/susfoodtech

Sustainability spotlight

The most common antimicrobial agents used in foods, such as benzoates, sorbates, and propionates, are produced with significant environmental impacts. Additionally, some synthetic antimicrobials are linked to human health problems. This review exposes the use of fermentates from lactic acid bacteria (LAB) as alternative antimicrobials. Fermentates are complex mixtures from the fermentation of LAB containing inactivate cells, metabolites, and culture medium. Fermentates' sustainability comprises free waste, natural production, safe use, "clean label", and the possibility of using the food's by-products as the substrate for their production. Adequate fermentate development could improve the use of sustainable antimicrobials.

Introduction

Fermentation is one of the fundamental technologies of modern industrial biotechnology that supports food, water, environment, energy, and medicine, among other applications. Microorganisms are utilised as microbial factories¹ to produce food ingredients at high yields with a lower environmental impact. Throughout the centuries, fermented foods and beverages have played a crucial role in the evolution of culinary traditions, offering abundant nutrients and advantages. The fermentation process preserves food, extends its shelf life, and generates valuable bioactive compounds.² Optimising fermentation processes by carefully choosing suitable microorganisms and fermentation media enables the production of functional ingredients, such as enzymes, vitamins, additives, and antimicrobials, with less environmental impact. The selection of

microorganisms and media can also influence the efficiency and yield of production, thus reducing the resources required and the waste generated, resulting in sustainable technologies. When produced by conventional industrial methods, such as mass extraction or organic synthesis, these ingredients are often environmentally unsustainable.³

Food processors and consumers often prefer using natural antimicrobials from fermentation processes, as they are considered more natural and label-friendly alternatives to using chemicals such as propionates, sorbates, or benzoates.^{4–8} Natural food preservation additives using bioprotective cultures could be an alternative to chemical preservatives.⁷ Cell-free supernatants (CFS) from lactic acid bacteria (LAB) have been widely studied as antimicrobials since they contain the metabolites derived from fermentation and/or secondary microbial products from metabolism.¹ CFS from several LAB have demonstrated their efficacy as antimicrobials against bacteria and fungi.⁹

Depending on the fermentation medium used, CFS from lactic acid bacteria can be included in the food formulation,

Open Access Article. Published on 15 January 2024. Downloaded on 1/15/2024 3:06:07 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.



Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de Las Américas Puebla, San Andrés Cholula 72810, Mexico. E-mail: emma.mani@udlap.mx

Review

Sourdoughs as Natural Enhancers of Bread Quality and Shelf Life: A Review

Ricardo H. Hernández-Figueroa , Emma Mani-López , Enrique Palou *  and Aurelio López-Malo 

Chemical, Food, and Environmental Engineering Department, Universidad de las Américas Puebla, San Andrés Cholula, Puebla 72810, Mexico; ricardoh.hernandezf@udlap.mx (R.H.H.-F.); emma.mani@udlap.mx (E.M.-L.); aurelio.lopezm@udlap.mx (A.L.-M.)

* Correspondence: enrique.palou@udlap.mx

Abstract: Sourdough is a key component in traditional and artisanal bread making. It imparts unique flavors and textures to bread, which are highly sought after by consumers. The use of sourdoughs to prepare bakery products has been researched for more than 30 years, and accumulated research shows the performance of sourdoughs as an alternative to improve the organoleptic characteristics of bread and its shelf life. The purpose of this review is to present an overview of the research carried out on the use of sourdoughs from lactic acid bacteria and their benefits in the quality characteristics of bread, as well as to present relevant and recent information on the use of sourdoughs and their aqueous extracts for the preservation of bakery products. Also, the advances in the identification of antifungal compounds have been revised. In general, it has been shown that incorporating sourdoughs into the bread formulation positively impacts the product's flavor and helps slow down the bread's aging process and spoilage. Also, it has been observed that the bioactive compounds formed by lactic acid bacteria (LAB) during sourdough fermentation and their extracts have an antimicrobial, especially antifungal, capacity that significantly helps increase bread's shelf life. Studying sourdough as part of fermentation processes and product development is essential to improve bread production's quality, diversity, and sustainability, and to advance our understanding of the science behind this food tradition.

Keywords: sourdough; lactic acid bacteria; bread quality; antifungals; shelf life



Citation: Hernández-Figueroa, R.H.; Mani-López, E.; Palou, E.; López-Malo, A. Sourdoughs as Natural Enhancers of Bread Quality and Shelf Life: A Review. *Fermentation* 2024, 10, 7. <https://doi.org/10.3390/fermentation10010007>

Academic Editor: Ronnie Willaert

Received: 16 November 2023

Revised: 14 December 2023

Accepted: 18 December 2023

Published: 21 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Bread is one of the most consumed fermented foods in the world and is an important part of the food base of many countries [1]. In general, bread is a product made by baking a dough previously fermented with yeast and, in some types of bread, other micro-organisms that give it the important characteristics and quality attributes of this product. However, fresh bread has a short shelf life, governed mainly by physicochemical alterations known as aging and mold growth on the product's surface. To improve the shelf life of bakery products, the baking industry has used the incorporation of synthetic additives and antimicrobial agents, which have been shown to have the ability to reduce both the aging process of bread and the growth of molds on the surface of baking products. However, consumer demand for natural products or products without synthetic additives has generated the search for new "natural" alternatives that help replace these synthetic additives and maintain the shelf life of bread [2,3].

One of the oldest ways of bread leavening is sourdough fermentation, converting cereal flour into attractive, tastier, and more digestible products [1,4]. An alternative approach that has attracted the attention of the scientific community in recent years is the use of sourdough to leaven various bakery products, as well as to incorporate it into the formulation of other products, which creates research opportunities in the use of sourdoughs and their fermentation products with very diverse applications and approaches [1,5]. An alternative that has attracted attention in recent years is to use sourdough together with baker's yeast

Vera-Santander, V. E., Hernández-Figueroa, R. H., Jiménez-Munguía, M. T., Mani-López, E., & López-Malo, A. (2023). Health benefits of consuming foods with bacterial probiotics, postbiotics, and their metabolites: a review. *Molecules*, 28(3), 1230.

Review

Health Benefits of Consuming Foods with Bacterial Probiotics, Postbiotics, and Their Metabolites: A Review

Victor E. Vera-Santander, Ricardo H. Hernández-Figueroa, María T. Jiménez-Munguía, Emma Mani-López and Aurelio López-Malo *

Department of Chemical, Food and Environmental Engineering, Universidad de las Américas Puebla, Puebla 72810, Mexico

* Correspondence: aurelio.lopezm@udlap.mx

Abstract: Over the years, probiotics have been extensively studied within the medical, pharmaceutical, and food fields, as it has been revealed that these microorganisms can provide health benefits from their consumption. Bacterial probiotics comprise species derived from lactic acid bacteria (LAB) (genus *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Streptococcus*), the genus *Bifidobacterium*, and strains of *Bacillus* and *Escherichia coli*, among others. The consumption of probiotic products is increasing due to the current situation derived from the pandemic caused by COVID-19. Foods with bacterial probiotics and postbiotics are premised on being healthier than those not incorporated with them. This review aims to present a bibliographic compilation related to the incorporation of bacterial probiotics in food and to demonstrate through in vitro and in vivo studies or clinical trials the health benefits obtained with their metabolites and the consumption of foods with bacterial probiotics/postbiotics. The health benefits that have been reported include effects on the digestive tract, metabolism, antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, and psychobiotic properties, among others. Therefore, developing food products with bacterial probiotics and postbiotics is a great opportunity for research in food science, medicine, and nutrition, as well as in the food industry.

Keywords: food; bacterial probiotics; postbiotics; lactic acid bacteria; health benefits

Citation: Vera-Santander, V.E.; Hernández-Figueroa, R.H.; Jiménez-Munguía, M.T.; Mani-López, E.; López-Malo, A. Health Benefits of Consuming Foods with Bacterial Probiotics, Postbiotics, and Their Metabolites: A Review. *Molecules* 2023, 28, 1230. <https://doi.org/10.3390/molecules28031230>

Academic Editor: Monica Rosa Loizzo

Received: 8 December 2022

Revised: 11 January 2023

Accepted: 25 January 2023

Published: 27 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Probiotics are defined as microorganisms that, when consumed in adequate doses or concentrations, can benefit the consumer's health [1]. Zucko et al. [2] noted that the benefits of probiotics range from the relief of gastrointestinal disorders to help the treatment of allergies, obesity, depression, bacterial vaginosis, and the improvement of the gastrointestinal tract, among many others. Currently, a wide variety of microorganisms are considered bacterial probiotics, of which a considerable portion belongs to the group of lactic acid bacteria (LAB), mainly of the genus *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Streptococcus* [3,4]. In addition, other non-LAB microorganisms are also considered bacterial probiotics, including some species of bifidobacteria, *Bacillus*, and *Escherichia coli*, among others [4]. Figure 1 shows selected species that could be considered probiotics; however, the strain level should also be checked for specific health benefits.

Due to the recent COVID-19 pandemic, there has been concern about improving health wellbeing and avoiding the spread of the virus. Hence, society began to consume foods that could raise the immune system. Since foods with probiotics can contribute to health (including the immune system), there has been an increase in demand for these products. As a result, the global probiotics market in 2022 was 68.56 billion USD. Still, this value is estimated to increase to 133.92 billion USD by 2030, due to the high consumption of probiotic products triggered by the pandemic [5].

Soto-Reyes, N., Dávila-Rodríguez, M., Lorenzo-Leal, A. C., Reyes-Jurado, F., Mani-López, E., Hernández-Figueroa, R., ... & López-Malo, A. (2022). Prospects for food applications of products from microorganisms. In *Research and Technological Advances in Food Science* (pp. 195-229). Academic Press.

C H A P T E R

8

Prospects for food applications of products from microorganisms

Nohemí Soto-Reyes, Mónica Dávila-Rodríguez, Ana C. Lorenzo-Leal, Fatima Reyes-Jurado, Emma Mani-López, Ricardo Hernández-Figueroa, Jocksan I. Morales-Camacho, and Aurelio López-Malo

Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla, San Andrés Cholula, Puebla, Mexico

Introduction

Microorganisms such as bacteria, yeasts, molds, and microalgae have gained much importance, and food science and technology used them in factories to obtain different products such as vitamins, antibiotics, pigments, enzymes, among others. Some of these have health and nutrition benefits, likewise techno-functional properties which could be used in order to design new food products or for enhancement existing foodstuff. In addition to this, in the last years there is a demand for safe and healthy foods replacing synthetic food additives due many of them have shown side effects for human health. In this sense, many microbial metabolites require approval from the legislative authorities in order to guarantee the safety of them and their use as food additives. Different legislative authorities such as the United States Food and Drug Administration (FDA), the European Food Standards Authority (EFSA), and The World Health Organization (WHO) have recognized the negative effects of synthetic food coloring agents, for this reason many studies have carried out to study pigments as microbial metabolites that can be used as natural ingredients into a food, likewise due color plays a significant role in the food production, different microbial pigments have been approved by organizations as the European Union (Sen, Barrow, & Deshmukh, 2019).

Also, microbial production is recognized as an alternative to obtain biopolymers that can be used as texturizing agents; many of them are used (or could be used) as stabilizer agents

Participaciones en congresos

Latin food 2022. Antifungal capacity of extracts from poolish-type sourdoughs fermented with *Lb. plantarum* against the growth of spoilage bread molds.



Antifungal capacity of extracts from poolish-type sourdoughs fermented with *Lb. plantarum* against the growth of spoilage bread molds

Hernández-Figueroa, R.^{1*}, Lopez-Malo, A.¹, Mani-López, E.

¹ Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental. Universidad de las Américas Puebla. Ex-Hacienda Santa Catarina Mártir, 72810 San Andrés Cholula, Puebla, México

*ricardoh.hernandezf@udlap.mx

Abstract

The current increase in the demand for additive-free food products, natural antimicrobial agents have risen as new alternatives. Even bakery products have not been the exception as consumers search for clean labels on these products. However, bread presents several disadvantages when compared with other food products. For example, it has a limited shelf life due to the growth of several molds. A way to extend the shelf life of bread is using the aqueous extracts (AE) of sourdoughs, as it has been shown that these extracts can decrease the growth of several molds that can cause bakery products spoilage [1][2]. Additionally, during the fermentation of sourdoughs, compounds like organic acids and peptides are generated, which also possess antimicrobial effects [3]. Therefore, the objective of this study was to evaluate the inhibitory capability of the AE obtained from poolish-type sourdoughs fermented with *Lactobacillus plantarum* in the growth of *A. niger*, *Penicillium chrysogenum* and *P. coriophyllum*. Besides, the effect of different times of fermentation (24, 48, and 72 hours) were analyzed. The incorporation of *Lb. plantarum* to sourdoughs significantly affected ($p < 0.05$) the pH and titratable acidity. There was a decrease in pH, while the acidity increased, indicating the production of different organic acids. Acetic and lactic acid were identified through High Performance Liquid Chromatography (HPLC) at concentrations ranging from 0.1 to 0.2% and 1 – 2 %, respectively. However, there was no significant difference ($p > 0.05$) in the sourdough's pH and titratable acidity when different fermentation times were analyzed. Concentrations between 20 and 33 % of AE slowed the growth of the analyzed molds, with *A. niger* presenting the greatest resistance. In conclusion, the incorporation of *Lb. plantarum* to

**10th Food Science,
Biotechnology & Safety Congress**
Asociación Mexicana de Ciencia de los Alimentos A.C.
MEXICAN ASSOCIATION OF FOOD SCIENCE

PUEBLA
MÉXICO | 16-18 NOVIEMBRE 2022

Constancia congreso Latin Foods 2022



Mexican Association of Food Science

This certificate is presented to:

Hernández Figueroa, Ricardo; Lopez-Malo, Aurelio; Mani-López, Emma.

In recognition for the oral presentation of the work entitled:

Antifungal capacity of extracts from poolish-type sourdoughs fermented with *Lb. plantarum* against the growth of spoilage bread molds

at the 10th Food Science, Biotechnology and Safety Congress Latin Food 2022 which took place on November 16-18 in Puebla, Mexico.


Dr. Rosa María Rodríguez Jasso
President of AMECA


Dr. Gilber Vela Gutiérrez
President of the Organizing Committee


Dr. Celeste C. Ibarra Herrera
President of the Scientific Committee

Constancia Encuentro Nacional de la AMIDIQ 2023



AMIDIQ
Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

XLIV
ENCUENTRO NACIONAL DE LA
AMIDIQ
Investigación e industria: inclusión, retos y oportunidades
para la Ingeniería Química en México

UDLAP®

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia
en Ingeniería Química A.C.

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Ricardo Hilario Hernandez Figueroa, Aurelio Lopez-Malo, Emma Mani Lopez.

Por la presentación del trabajo:

**PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN HARINA DE TRIGO FERMENTADA POR DOS LACTOBACILOS
Y SU ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA**

En el área de **INGENIERÍA DE ALIMENTOS** en modalidad **CARTEL**
ID: 77

XLIV Encuentro Nacional de la AMIDIQ

Dr. Aarón Romo Hernández
Presidente del Comité Organizador

Dr. Jorge Ramón Robledo Ortiz
Presidente Nacional de AMIDIQ

Dr. Tomás Viveros García
Presidente del Comité Técnico

Huatulco, Oaxaca, México 30 de mayo al 2 de junio de 2023

Memorias de Congreso: Encuentro Nacional de la AMIDIQ 2023

Producción de ácidos orgánicos en harina de trigo fermentada por dos Lactobacilos y su actividad antifúngica

Memorias del XLIV Encuentro Nacional de la AMIDIQ
30 de mayo al 2 de junio de 2023

PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN HARINA DE TRIGO FERMENTADA POR DOS LACTOBACILOS Y SU ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Ricardo H. Hernández-Figueroa^a, Aurelio López-Malo^a, Emma Mani-López^a

^a Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla, Santa Catarina Mártir SN, San Andrés Cholula, Puebla, 72810, México. ricardoh.hernandezf@udlap.mx

Resumen

La incorporación de extractos obtenidos de masas madre fermentadas con bacterias ácido lácticas (BAL) pueden ser una alternativa viable para el reemplazo de los antimicrobianos sintéticos comúnmente utilizados en la industria de la panificación. La generación de ácidos orgánicos por parte de las BAL durante la fermentación de las masas ha mostrado tener capacidad para disminuir el crecimiento de distintos mohos en pan. Por esta razón, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la capacidad antifúngica y la producción de ácidos orgánicos producidos durante la fermentación de masas madre con dos lactobacilos diferentes (*Lactobacillus acidophilus* o *L. casei* 21/1). En general, los extractos acuosos obtenidos de las masas madre presentaron una capacidad fungistática disminuyendo de manera significativa la velocidad de crecimiento de los mohos estudiados. La capacidad fungistática de los extractos se atribuyó principalmente a los ácidos láctico y acético formados durante la fermentación de la masa madre.

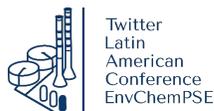
Introducción

En países de Europa por muchos años y de manera tradicional, se ha utilizado la incorporación de masas madre para la elaboración de pan, ya que esta mejora algunas de las características organolépticas del pan, como el sabor, color, olor y textura. Las masas madre o masas agrias (*sourdough*), son el resultado de fermentaciones que ocurren de manera espontánea cuando harinas de diferentes granos (trigo y/o cebada) se mezclan con una cantidad considerable de agua, y en condiciones favorables se promueve el crecimiento de microorganismos, en específico de levaduras y BAL propias de las harinas. Se ha demostrado que, durante estas fermentaciones, se generan compuestos que presentan un efecto antimicrobiano, por ejemplo ácidos orgánicos (ácido acético, láctico y fenil-láctico), dipéptidos cíclicos, ácidos grasos y ácidos derivados de péptidos y bacteriocinas [1-3]. Además, se ha investigado el uso directo de masa madre fermentada en la formulación de pan como método para retardar el crecimiento de microorganismos causantes de deterioro. Luz et al. [1] demostraron que la adición de masa madre adicionada con suero de leche y fermentada con *Lactobacillus plantarum* CECT 749 y *L. bulgaricus* CECT 4005 a la formulación del pan aumentó la vida útil del pan en 2 y 4 días, respectivamente. Por esta razón, el objetivo de esta investigación fue analizar la capacidad que tiene las masas madre inoculadas con *L. acidophilus* o *L. casei* 21/1 y sus extractos acuosos para inhibir el crecimiento de mohos en el pan y de esta manera mejorar la vida útil del producto, así como sus características fisicoquímicas.

Metodología

Para la preparación de las masas madre se utilizaron las cepas *L. acidophilus* y *L. casei* 21/1 obtenidas del cepario de la UDLAP previamente reactivadas en caldo MRS durante 24 horas. La masa madre se preparó a partir de una formulación estándar utilizando harina de trigo refinada (contenido de proteína de 11.1 g/100 g) y agua a partes iguales (1:1) y 1% (p/p) del sedimento de células húmedas de *L. acidophilus* o *L. casei* 21/1. Las masas madre fueron fermentadas a tres distintos tiempos (24, 48 y 72h). *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* y *P. corylophilum* se obtuvieron del cepario de la UDLAP. Los mohos se cultivaron en agar PDA durante 7 días a 25 °C. Luego, se vertieron 5 ml de una solución estéril de Tween 80 (0.4 % p/v) sobre la superficie de cada cultivo de moho y se agitó suavemente durante 2 min para favorecer la recolección de las esporas. El número de esporas se ajustó a 10⁴ esporas/mL. Para la determinación de pH se utilizó un potenciómetro Hanna Instruments (HI 2210) y el método 02-52 de la

Constancia de participación en congreso “Twitter Latin American Conference EnvChemPSE



July 20th, 2023

This is to certify that the poster

Optimización de la producción de ácido láctico mediante fermentación con diferentes bacterias ácido lácticas

R. H. Hernández-Figueroa, A. López-Malo, E. Mani-López, N. Ramírez-Corona.

has been presented in the 2023 Twitter Latin American Conference on Environmental and Chemical Process System Engineering #LatinEnvChemPSE.



Prof. Adrián Bonilla-Petriciolet

INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE AGUASCALIENTES

Chairman of the Organizing Committee of #LatinEnvChemPSE



Artículo de divulgación

Hernández, R.H. y López-Malo, A. (2023). ¿Qué es el gluten? ¿Por qué es especial? Contexto UDLAP. Disponible en: <https://contexto.udlap.mx/que-es-el-gluten-por-que-es-especial/>.



30

¿Qué es el gluten? ¿Por qué es especial?

May

Destacada, Innovación y tecnología

Ciencia de Alimentos, Contexto, divulgación, Gluten, ingeniería de alimentos, pan, Panificación, UDLAP

Siempre han llamado mi atención los slogans de la industria de los alimentos, no por sus atributos en cuanto a estrategias de mercadotecnia, sino más bien porque distan mucho de lo que la industria alimentaria es en sí misma, es decir, acotan en frases muy cortas procesos tan complejos y fascinantes que de antemano anulan en el consumidor imaginar y dimensionar el trasfondo del producto que tiene en su mesa: paradojas de un mundo moderno. en cual grandes empresas de alimentos

Vera-Santander, V.E.; Hernández-Figueroa, R.H.; Jiménez-Munguía, M.T.; Mani-López, E.; López-Malo, A. Health Effects of Metabolites from Probiotic Bacteria. Encyclopedia. Available online: <https://encyclopedia.pub/entry/44056> (accessed on 23 February 2024).

Health Effects of Metabolites from Probiotic Bacteria

Subjects: Food Science & Technology

Contributor: Victor E. Vera-Santander, Ricardo H. Hernández-Figueroa, María T. Jiménez-Munguía, Emma Mani-López, Aurelio López-Malo

Probiotics have been extensively studied within the medical, pharmaceutical, and food fields, as it has been revealed that these microorganisms can provide health benefits from their consumption. Bacterial probiotics comprise species derived from lactic acid bacteria (LAB) (genus *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Streptococcus*), the genus *Bifidobacterium*, and strains of *Bacillus* and *Escherichia coli*, among others. The growth of bacterial probiotics is involved in fermentation, which metabolizes the nutrients of the medium and produces a wide variety of metabolic compounds. Probiotics are defined as microorganisms that, when consumed in adequate doses or concentrations, can benefit the consumer's health.

Keywords: probiotic bacteria ; metabolites ; health effects

1. Introduction

The growth of bacterial probiotics is involved in fermentation, which metabolizes the nutrients of the medium and produces a wide variety of metabolic compounds. Metabolites from bacterial probiotics have been studied as they may be the main cause of positive effects on consumer health [1]. Most bacterial probiotics belong to the LAB group, which primarily synthesizes lactic acid from carbohydrate fermentation [2]. Bacterial probiotics excrete secondary metabolites such as organic acids, short-chain fatty acids, enzymes, peptides, teichoic acids, peptidoglycans, exopolysaccharides (EPSs), vitamins, plasmalogens, neurotransmitters, biosurfactants, amino acids, and flavonoid-derived compounds such as desaminotyrosine, equol daidzein, noratirrol, terpenoids, and phenolic compounds, among others [3][4]. **Figure 1** shows a diagram of the health effects that have been studied concerning bacterial probiotic metabolites. Various components have been investigated, including short-chain fatty acids (SCFAs), bacteriocins, enzymes, teichoic acids, EPSs, vitamins, plasmalogens, and biosurfactants.

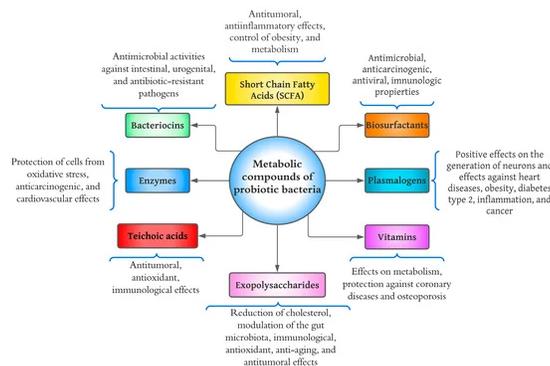


Figure 1. Diagram of health benefits of metabolic compounds of probiotic bacteria.

2. Short-Chain Fatty Acids

SCFAs are the main metabolites produced by the fermentation of intestinal bacteria; these compounds are produced from the fermentation of non-digestible carbohydrates (prebiotics) by the intestinal microbiota [5]. The SCFAs primarily produced are acetate, propionate, and butyrate. The metabolic pathways of acetate are very diverse and depend on the type of bacteria, while the synthesis of propionate and butyrate depends on a specific substrate [6]. Gill et al. [7]

Hernández-Figueroa, R.H.; Mani-López, E.; Palou, E.; López-Malo, A. Sourdough and Its Effect on Bread Properties. Encyclopedia. Available online: <https://encyclopedia.pub/entry/53190> (accessed on 23 February 2024).

Sourdough and Its Effect on Bread Properties

Subjects: Food Science & Technology

Contributor: Ricardo H. Hernández-Figueroa, Emma Mani-López, Enrique Palou, Aurelio López-Malo

Sourdough is a key component in traditional and artisanal bread making. It imparts unique flavors and textures to bread, which are highly sought after by consumers. Accumulated research shows the performance of sourdoughs as an alternative to improve the organoleptic characteristics of bread and its shelf life.

Keywords: sourdough ; lactic acid bacteria ; bread quality ; antifungals ; shelf life

1. Introduction

Bread is one of the most consumed fermented foods in the world and is an important part of the food base of many countries ^[1]. In general, bread is made by baking a dough previously fermented with yeast and, in some types of bread, other microorganisms that give important characteristics and quality attributes to this product. However, fresh bread has a short shelf life, governed mainly by physicochemical alterations known as aging and mold growth on the product's surface. To improve the shelf life of bakery products, the baking industry has used the incorporation of synthetic additives and antimicrobial agents, which have been shown to have the ability to reduce both the aging process of bread and the growth of molds on the surface of baking products. However, consumer demand for natural products or products without synthetic additives has generated the search for new "natural" alternatives that help replace these synthetic additives and maintain the shelf life of bread ^{[2][3]}.

One of the oldest ways of bread leavening is sourdough fermentation, converting cereal flour into attractive, tastier, and more digestible products ^[4]. An alternative approach that has attracted the attention of the scientific community in recent years is the use of sourdough to leaven various bakery products, as well as to incorporate it into the formulation of other products, which creates research opportunities in the use of sourdoughs and their fermentation products with very diverse applications and approaches ^[5]. An alternative that has attracted attention in recent years is to use sourdough together with baker's yeast to produce bread at an industrial level and have the benefits of its incorporation in the formulation ^[6]. For many years, sourdoughs have been used in the European and Western regions to make bread ^[7] since it has been observed that incorporating them helps maintain the product's organoleptic characteristics and delays the growth of molds on the product's surface. This fermented dough has a complex microbiome that mainly includes lactic acid bacteria and yeasts ^[4]. It has been shown that during the formation of sourdoughs, compounds such as organic acids, peptide compounds, and exopolysaccharides are formed, which help maintain the shelf life of the product, preserving the quality characteristics of the bread and reducing the rate in the growth of molds on bread surface ^{[8][9][10][11]}. Likewise, in recent years, the ability of aqueous extracts from fermented sourdoughs to inhibit the growth of the main molds that spoil bread has been demonstrated, thus generating promising alternatives as natural antimicrobials in bakery products ^{[11][12][13][14][15]}.

Bread is highly perishable due to its composition, leading to a quality decline from physicochemical and microbiological changes after baking. Post-baking cooling results in moisture loss, affecting crumb and crust texture. Over time, starch retrogradation and moisture loss increase hardness. Mold growth on the bread surface poses a significant economic challenge for the baking industry ^[16].

Molds proliferate easily in bread because it is rich in carbohydrates (70–80 g carbohydrates/100 g bread), with water activity values between 0.94–0.97 and pH values around 6, which are optimal conditions for mold growth. Contamination of bakery products with mold spores, which are naturally found in the bakery environment, has been shown to occur after the baking process, during cooling, slicing, and packaging of the product, these last stages being the determinants to define the microbiological quality of these products ^{[16][17]}.

Penicillium and *Aspergillus* are common molds that cause bread spoilage due to their ability to thrive in diverse conditions, produce numerous spores, and exist in the environment. Notable species include *Penicillium roqueforti*, *P. paneum*, *P. corylophilum*, *P. chrysogenum*, and others, leading to blue-green spots on bread. *Aspergillus* species such as *A. chevalieri*

Conferencia de divulgación

Tendencias en investigación en ciencia de Alimentos



BUAP



La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla a través del Bachillerato Internacional "5 de Mayo" otorga la presente

Constancia

a: Mtro. Ricardo Hilario Hernández
Figueroa

por su participación como **conferencista** en el evento de la **Semana de Divulgación de la Ciencia 2023**, con la conferencia: *Tendencias en investigación en ciencia de alimentos*, que se realizó el día 19 de octubre de 2023.

Mtra. Fatima Castillo Galicia
Directora del Bachillerato Internacional "5 de Mayo"

