



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para
el Desarrollo

Incorporación de *Lactobacillus rhamnosus* a masas
panarias sin gluten en vistas a su impresión 3D.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

AUTOR/A: López López, Rebeca

Tutor/a: Pagán Moreno, M^a Jesús

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Incorporación de *Lactobacillus rhamnosus* a masas panarias sin gluten en vistas a su impresión 3D.

Rebeca López López, M^a Jesús Pagán Moreno¹

¹Food Investigation and Innovation Group, Food Technology Department, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain;
jpagan@tal.upv.es

RESUMEN

Debido a la actual preocupación por la salud y el bienestar físico, cada vez más población opta por el consumo de productos funcionales para mejorar su digestión y función intestinal. Una opción es la introducción en la dieta de alimentos que contengan probióticos los cuales confieren beneficios para la salud. El siguiente estudio muestra el comportamiento del *Lactobacillus rhamnosus* en una masa panaria elaborada con dos tipos de levaduras, con levadura química y otra con levadura panadera. Además, se analizó la supervivencia de dichas bacterias probióticas en el pan horneado, así como los parámetros texturales y fisicoquímicos para comprobar si dichas masas pueden ser utilizadas en estudios posteriores de impresión 3D. Según los resultados y comparando con las masas control previamente estudiadas, se seleccionó la formulación más adecuada en cuanto a supervivencia de probióticos y parámetros fisicoquímicos y texturales. En nuestro caso la levadura panadera fue la elegida obteniendo unos valores iniciales superiores a 10^7 ufc/g en las primeras dos horas de elaboración confiriéndole propiedades funcionales y con una supervivencia de 10^2 ufc/g tras el proceso de horneado. Además, visualmente poseía unas mejores características texturales que la masa elaborada con levadura química.

PALABRAS CLAVE: Probiótico (*Lactobacillus rhamnosus*), masa panaria, levadura química, levadura panadera, supervivencia.

RESUM

A causa de l'actual preocupació per la salut i el benestar físic, cada vegada més població opta pel consum de productes funcionals per a millorar la seua digestió i funció intestinal. Una opció és la introducció en la dieta d'aliments que continguen probiòtics els quals confereixen beneficis per a la salut. El següent estudi mostra el comportament del *Lactobacillus rhamnosus* en una massa panaria elaborada amb dos tipus de llevats, amb llevat químic i una altra amb llevat fornera. A més, es va analitzar la supervivència d'aquests

bacteris probiòtics en el pa enforat, així com els paràmetres texturals i fisicoquímics per a comprovar si aquestes masses poden ser utilitzades en estudis posteriors d'impressió 3D. Segons els resultats i comparant amb les masses control prèviament estudiades, es va seleccionar la formulació més adequada quant a supervivència de probiòtics i paràmetres fisicoquímics i texturals. En el nostre cas el llevat fornera va ser la triada obtenint uns valors inicials superiors a 107ufc/g en les primeres dues hores d'elaboració conferint-li propietats funcionals i amb una supervivència de 102 ufc/g després del procés d'enforat. A més, visualment posseïa unes millors característiques texturals que la massa elaborada amb llevat químic.

PARAULES CLAU: Probiòtic (*Lactobacillus rhamnosus*), massa panaria, llevat químic, llevat fornera, supervivència.

ABSTRACT

Due to the current concern for health and physical well-being, more and more people are opting for the consumption of functional products to improve their digestion and intestinal function. One option is the introduction into the diet of foods containing probiotics, which confer health benefits. The following study shows the behavior of *Lactobacillus rhamnosus* in a bread dough made with two types of yeast, one with chemical yeast and the other with baker's yeast. In addition, the survival of these probiotic bacteria in the baked bread was analyzed, as well as the textural and physicochemical parameters to check if these boughs can be used in subsequent 3D printing studies. According to the results and comparing with previously studied control dough, the most suitable formulation in terms of probiotic survival and physicochemical and textural parameters was selected. In our case, baker's yeast was chosen, obtaining initial values higher than 107 cfu/g in the first two hours of elaboration, giving it functional properties and with a survival of 102 cfu/g after the baking process. In addition, it had visually better textural characteristics than the dough made with chemical yeast.

KEYWORD: Probiotic (*Lactobacillus rhamnosus*), bread dough, chemical yeast, baker's yeast, survival

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la sociedad se preocupa más por lo que come, esto lleva al consumo de una dieta que incluya alimentos que mejoren su salud y bienestar (Bustos, 2017).

En base a esto, llama especialmente la atención la microbiota intestinal debido a su relación con un buen estado de salud (Salminen et al., 2021), es clave para el desarrollo del sistema inmunitario (Álvarez et al., 2021) y está también involucrada en la regulación de distintas funciones humanas, como por ejemplo participar en el crecimiento del individuo (Jin et al., 2019), prevenir la colonización por microorganismo patógenos (HU et al., 2022) y mantener la integridad de la barrera intestinal (Jin et al., 2019).

También puede interactuar con los nutrientes ingeridos y de esta forma alterar tanto su eficacia como biodisponibilidad, afectando de esta manera a la fisiología del huésped (Xiao et al., 2022).

Las alteraciones en su composición pueden afectar a varios órganos metabólicos, como es el caso del hígado y del tejido adiposo, contribuyendo así a la inflamación metabólica (Tilg et al., 2020).

Así, la microbiota intestinal juega un papel importante en los procesos metabólicos, fisiológicos, inmunológicos y nutricionales (Wang et al., 2018). Para mantener el equilibrio de dicha microbiota el uso de probióticos es una de las mejores opciones. Los probióticos son microorganismos vivos que confieren beneficios para la salud del huésped cuando se consumen en cantidades adecuadas (FAO y OMS, 2002). Estos microorganismos probióticos se pueden introducir en el intestino humano a través de productos alimenticios, como es el caso de los productos funcionales. Estos productos pueden ser fermentados o no fermentados. Otra forma de introducirlos en la dieta es través de suplementos dietéticos, siempre y cuando tengan un recuento viable de un mínimo de 10^7 UFC/mL o g de producto final en el momento del consumo para proporcionar beneficios para la salud (Yao et al., 2020).

En el mercado la mayoría de los productos probióticos son a base de lácteos, esto presenta un inconveniente para la población alérgica o intolerante a la lactosa (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010). Por ello, existe la necesidad de desarrollar productos probióticos no lácteos, como es el caso de los productos de panadería (Vijaya Kumar, Vijayendra y Reddy, 2015). Es además, especialmente interesante la incorporación a productos elaborados utilizando harinas sin gluten vista la prevalencia de personas celiacas en sociedad actual. En España se estima una prevalencia que oscila entre 1/71 en la población infantil y 1/357 en la población adulta (Mariné et al., 2011).

La adición de probióticos a este tipo de alimentos además de aportar beneficios a la salud del consumidor, brindan mejoras tecnológicas ya que aumentan su volumen y mejoran sus propiedades sensoriales como el aroma o aportan sabor al alimento (Handa et al., 2012; Zannini et al., 2012).

Los probióticos más utilizados comercialmente son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Arepally et al., 2019; Arrieta et al., 2014).

La incorporación de estos probióticos en productos de panadería resulta de gran interés económico, sin embargo, presentan un reto tecnológico debido a que las altas temperaturas de horneado tienen un efecto negativo en la supervivencia de las bacterias probióticas (Castillo-Escandón et al., 2019). Dicha supervivencia está influenciada por las condiciones del procesamiento, tales como la temperatura, el tiempo de horneado o el contenido de humedad inicial de la masa (Zhang et al., 2018). Existen varias estrategias para preservar los probióticos durante el horneado, como es el uso de recubrimientos o la encapsulación en películas comestibles (Zhang et al., 2018), siendo el almidón es uno de los materiales más comunes para encapsular (Ghasemi et al., 2022). Además, existen otras alternativas como la inclusión de prebióticos en la masa panaria con el fin de mejorar su biofuncionalidad (Adedeji et al., 2022).

Muchos estudios sugieren que los microorganismos probióticos son más estables en una matriz alimentaria con bajo contenido en humedad, para ello se puede acelerar la tasa de secado durante el horneado aumentando la relación superficie-volumen del alimento (Zhang et al., 2018). Una estructura con una alta relación superficie-volumen se puede obtener a través de la impresión tridimensional (3D), por ello uno de las finalidades de este estudio es la posterior impresión en 3D de la masa panaria con probióticos.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, el objetivo de este estudio fue analizar el comportamiento del *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a masas panarias sin gluten elaboradas con dos tipos de levaduras: química y panadera, antes y después del proceso de horneado. Además, de la supervivencia del probiótico se evaluaron las características fisicoquímicas de las masas antes del horneado para su posterior aplicación a la impresión 3D y las propiedades fisicoquímicas y texturales de los panes después del horneado.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

El plan de trabajo seguido se muestra en la figura 1.

| Fase I: LAB 0,13% - LQ y LP | Fase II: LAB 0,98% - LP |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Curva de crecimiento - Caracterización F-Q de la masa - Comportamiento probiótico tras el horneado (miga y corteza) - Caracterización F-Q (miga y corteza) - Caracterización textural de los panes (miga) | <ul style="list-style-type: none"> - Curva de crecimiento - Caracterización F-Q de la masa - Comportamiento probiótico tras el horneado (miga y corteza) - Caracterización F-Q (miga y corteza) - Caracterización textural de los panes (miga) |
| <p>LQ: Levadura química LP: Levadura panadera LAB: <i>Lactobacillus rhamnosus</i></p> | |

FIGURA 1. Plan de trabajo

El microorganismo probiótico utilizado en este estudio fue el *Lactobacillus rhamnosus* LA801 suministrado como complemento alimentario (Lactibiane ATB). Cada cápsula contiene $12 \cdot 10^9$ ufc y 0,4g de polvo de probiótico. La harina sin gluten que se empleó fue un preparado panificable sin gluten de almidón de maíz proporcionado por la empresa Sinblat (Sinblat Alimentación Saludable S.L., Foios, España). El agua, la sal, el aceite y tanto la levadura química como la levadura panadera se compraron en un supermercado local.

2.1. Elaboración de la masa panaria

Se elaboraron dos tipos de masas panarias una con levadura química y otra con levadura panadera, ambas siguiendo la metodología propuesta por Matas et al. (2022).

2.1.1 MASA PANARIA CON LEVADURA QUÍMICA

La formulación utilizada fue 55,93% agua, 39,95% harina sin gluten, 2,4% levadura química, 1,2% aceite de girasol y 0,39% sal y 0,13% de probiótico. Primero se incorporaron los componentes líquidos a una amasadora (Kenwood chef classic, KM400/99 plus, Kenwood Corporation, Tokyo, Japan) y después los secos. La masa se amasó durante 1 minuto a velocidad mínima y seguidamente 5 minutos a velocidad 2. La masa control se elaboró del mismo modo sin adición de probiótico.

2.1.2. MASA PANARIA CON LEVADURA PANADERA

En el caso de la elaboración de la masa con levadura panadera se utilizó el mismo procedimiento, pero con distintas cantidades de ingredientes: 41,46% de harina sin gluten, 0,4% de sal, 0,88% de levadura panadera, 55,9% de agua y 1,2% de aceite de girasol. En cuanto a la cantidad de probióticos en la fase I se añadieron a una concentración de 0,13% y en la fase II al 0,98%. La masa control se elaboró del mismo modo sin adición de probiótico.

2.2. Proceso de horneado

Para ello se hornearon cada una de las masas en bandejas individuales con una geometría rectangular simulando las dimensiones de un pan impreso en 3D, es decir, 7 cm de largo, 3 cm de ancho y una altura aproxima de 2-3 cm. Las condiciones de horneado fueron para la masa con levadura química 190°C durante 22 minutos y para las masas con levadura panadera 180°C 20 minutos. Una vez horneado el pan se dejó unos minutos que se atemperase y se procedió a la separación de la miga con ayuda de un bisturí.

2.3. Determinaciones analíticas

2.3.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Curvas de crecimiento en las masas panarias

Para evaluar la supervivencia y el comportamiento de las bacterias probióticas dentro las masas panarias, primero se realizaron curvas de crecimiento tanto de la masa elaborada con levadura química y 0,13% de probiótico como con levadura panadera con 0,13% y 0,98% de *L. rhamnosus*.

En el caso de la masa panaria elaborada con levadura química, se realizaron recuentos del microorganismo probiótico a las 0, 2, 4, 6 y 24 horas. A cada tiempo se realizaron siembras en profundidad, por duplicado, en MRS agar (Sharlab, Barcelona, España) incubándose a 37°C durante 48h. La curva se realizó por duplicado.

En el caso de la masa panaria elaborada con levadura panadera (con *Saccharomyces cerevisiae*) el tiempo 0 se correspondía a 30 minutos desde que se había elaborado la masa permitiendo de este modo una fermentación inicial, el resto de los tiempos analizados fueron los mismos que en el caso de la masa elaborada con levadura química. En este caso se utilizaron diferentes medios con la finalidad de diferenciar claramente la población de *L. rhamnosus* y de levaduras. Los medios utilizados fueron para *Saccharomyces* Sabouraud Cloranfenicol (Sharlab, Barcelona, España) y para los *Lactobacillus* MRS agar suplementado con cicloheximida (Sharlab, Barcelona, España).

La modelización de las curvas de crecimiento se realizó utilizando del software DMFit 3.5. (Baranyi, & Roberts, 1994). A partir de dicha modelización se obtuvieron los parámetros característicos del crecimiento/muerte microbiana: fase lag/hombro, población inicial, población final y velocidad de crecimiento.

Enumeración en corteza y miga.

Tras el proceso de horneado se procedió al recuento de bacterias probióticas y levaduras, en su caso, con la finalidad de conocer su viabilidad. Esto se realizó tanto en la corteza como en la miga, por separado. Los medios utilizados fueron los mismos que en el caso de la realización de la curva de crecimiento. Los panes elaborados con levadura química se analizaron inmediatamente tras el amasado de la masa (T0). Mientras que para aquellos elaborados con levadura panadera se analizaron panes elaborados tras 30 minutos (T0) y tras 2 horas de fermentación (T2).

2.3.2. ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS

Todos los análisis fisicoquímicos fueron realizados en las masas elaboradas con levadura química a T0 y con levadura panadera a T0 y T2. En el caso de los panes se analizó por separado la corteza y la miga, previamente

trituras. En todos los casos se analizó el control (sin probiótico) y las muestras con 0,13% de probiótico elaborados con levadura química y panadera, así como, los preparados con 0,98% de probiótico en la masa con levadura panadera. Los análisis se realizaron por triplicado.

Medición de pH

La medición de pH se realizó con un pHmetro digital (MM41 MultiMeter, Crison instruments, S.A., Barcelona, España).

Determinación de la humedad

Se determinó la humedad en base al método AOAC. 964.22 mediante el secado a vacío en una estufa de vacío (Vaciotem, J.P. Selecta, España) a $70 \pm 1^\circ\text{C}$ y por debajo de 100 mmHg de presión hasta obtener un peso constante (AOAC, 2000a).

Determinación de la aw

Las medidas se tomaron con ayuda del equipo AquaLab PRE (Decagon Devices, Inc., Pullman WA, Estados Unidos).

2.3.3. TEXTURA DE LOS PANES

Se determinó la textura de la miga de los panes mediante una prueba de análisis de perfil de textura con el texturómetro TA.XT.plus (Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, UK) utilizando el programa Texture Exponent 32 (Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, UK). La miga se extrajo del pan horneado una vez atemperado, con ayuda de un bisturí se separó la miga de la corteza y se realizaron cortes a la miga hasta conseguir una forma cuadrada de 2x2 cm. Para el análisis se utilizó una sonda cilíndrica de aluminio de 4 cm de diámetro y una celda de carga de 50 kg. La deformación fue del 40% de la longitud original de la muestra y la velocidad utilizada de la cruceta fue de 0,5 mm/s con 5 segundos de descanso entre los ciclos. A partir de este programa se determinaron distintos parámetros de textura, entre ellos la dureza, adhesividad, cohesión, elasticidad, gomosidad y resiliencia.

Las muestras analizadas fueron la miga de los panes elaborados con 0,13% de probiótico y con levadura química y panadera, así como, los elaborados con 0,98% de probiótico con levadura panadera. Los análisis se realizaron por triplicado.

2.5 Análisis estadístico

Para poder interpretar y correlacionar los resultados obtenidos en los distintos ensayos se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95 % ($p < 0,05$) para evaluar las diferencias entre las distintas masas panarias. Además, se realizó un análisis multivariable para ver la interacción entre los datos obtenidos y el tipo de masa y a su vez la diferencia que existía entre la masa en crudo y tras el horneado. Todos estos

análisis se llevaron a cabo con el programa Statgraphics Centurion 18, versión 18.1.13 (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. FASE I

3.1.1 Curvas de crecimiento

En esta fase, inicialmente y como se indica en la figura 2 se trabajó añadiendo 0,13% de probiótico en la masa panaria elaborada con levadura química. En la figura 2a se muestran los recuentos obtenidos y en la 2b la modelización de los mismos.

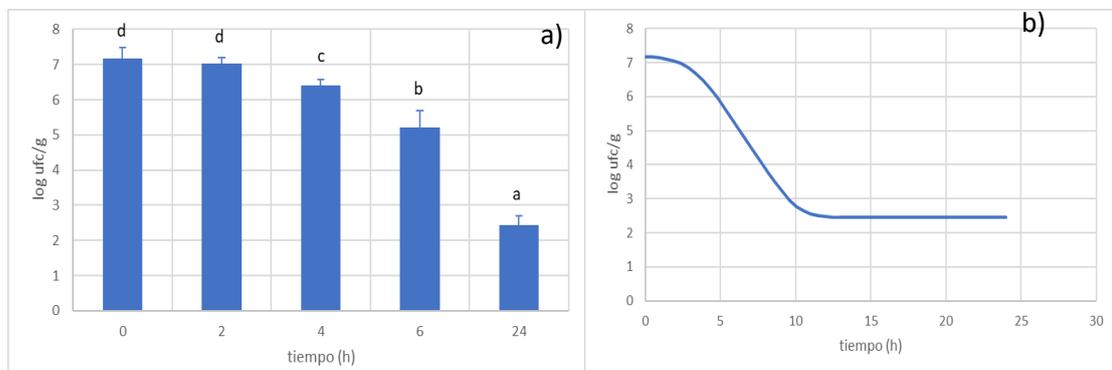


FIGURA 2.a) Recuentos y b) Modelización del comportamiento de *L. rhamnonus* en masas elaboradas con levadura química y 0,13% de probiótico.

La modelización se ajustó al modelo de Barany & Roberts completo, con una R^2 de $0,966 \pm 0,297$. Los parámetros obtenidos a partir de la modelización indicaron una concentración inicial de células de $7,17 \pm 0,08$ ufc/g lo que confiere a la masa carácter probiótico, una fase lag/hombro de $3,14 \pm 0,35$ horas lo que indica que hasta este tiempo la concentración inicial de células se mantuvo y una concentración final de células de $2,45 \pm 0,12$ ufc/g esto quiere decir que a las 24h la cantidad de células presentes en la masa estuvo muy alejada de la requerida para conferirle el carácter probiótico. Por ello, según el comportamiento observado del *Lactobacillus rhamnosus*, se puede concluir que este tipo de masa no es favorable ni para su crecimiento ni para su supervivencia en el tiempo. Debido a esto se decidió probar con otro tipo de masa elaborada con levadura panadera, para ver si era más beneficiosa en cuanto a la conservación de células viables probióticas.

En la figura 3 se muestra la evolución de la cepa probiótica y levaduras en las masas panarias elaboradas con levadura panadera. El comportamiento de los probióticos fue diferente al detectado con el uso de levadura química como se puede observar en la figura 3a. En la figura 3b se muestra la modelización, obtenida a partir de los recuentos de *L. rhamnosus*. Esta se ajustó a al modelo

de Barany y Roberts no asintótico, con una R^2 de $0,558 \pm 0,543$ y en esta se aprecia un incremento de los niveles de este microorganismo. Los parámetros de crecimiento indican una concentración inicial de células de $6,9 \pm 0,21$ ufc/g que como en el caso de la masa elaborada con levadura química le confieren carácter probiótico. Además, se observa una fase lag/hombro de $7,53 \pm 13,1$ horas lo que indica la estabilidad de los microorganismos en la masa panaria y posteriormente un ligero incremento corroborado por una velocidad de crecimiento de $0,078 \pm 0,05$ (log ufc /g)h⁻¹. Al realizar el ANOVA no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) para la interacción microorganismo-tiempo, excepto a las 24 horas para los lactobacillus y entre las 0 y 6h para las levaduras, esto indica que no hubo apenas evolución en el tiempo ni de los microorganismos probióticos ni de las levaduras. Además, los niveles de ambos fueron similares, excepto a las 24 horas. Esto indica que la formulación empleada favorece la supervivencia de los probióticos utilizados en este estudio y además garantiza el mantenimiento de los niveles iniciales.

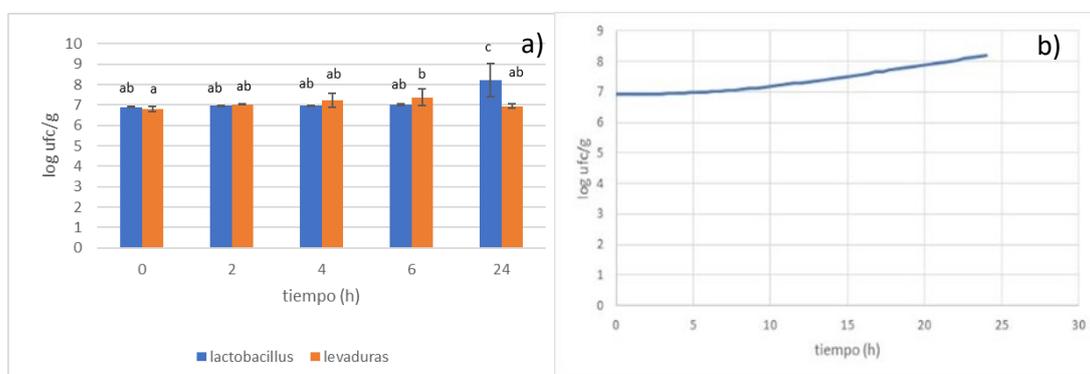


FIGURA 3. a) Recuentos del probiótico y levaduras y b) Modelización del comportamiento del *L. rhamnosus* en masas elaboradas con levadura panadera y 0,13% de probiótico.

Para determinar si existían diferencias en el recuento de LAB entre las dos masas panarias se realizó un ANOVA multifactorial considerando los factores masa (química o panadera) y tiempo. Los resultados indicaron que para todos los tiempos estudiados los recuentos fueron superiores en el caso de la masa elaborada con levadura panadera.

3.1.2. Características fisicoquímicas de las masas

Considerando que las masas control, sin probiótico, reunían las características adecuadas para ser impresas en 3D se comprobó las variaciones que estas experimentaban al ser formuladas con microorganismos probióticos.

En el caso de las masas elaboradas con levadura química se consideró el T0 (inmediatamente tras la elaboración) puesto que el rápido descenso de la población probiótica no aconsejaría posponer el proceso de impresión. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos.

TABLA 1. Parámetros fisicoquímicos de las masas con levadura química control y con 0,13% de probiótico (C: control, P: probiótico, T0: tiempo 0)

| Muestra | pH | % Humedad | aw |
|---------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| CT0 | 7,06 ± 0,02 ^a | 60,500 ± 0,003 ^a | 0,976 ± 0,002 ^a |
| PT0 | 6,79 ± 0,02 ^b | 60,700 ± 0,002 ^a | 0,974 ± 0,004 ^a |

Las mismas letras indican grupos homogéneos según el ANOVA ($p > 0,05$).

Como se puede apreciar no se observaron diferencias en los valores de aw y humedad entre las masas con y sin probiótico. Por lo contrario, el valor de pH sí que fue menor en la masa con probiótico. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Fekri et al. (2020) donde se apreció que la adición de bacterias LAB probióticas reducía significativamente el pH en comparación con las muestras control sin probióticos. Al estar los valores obtenidos en la masa con probiótico dentro del rango tolerable en el proceso de impresión (4,98-6,91) según estudios previos de impresión de masas de Matas et al. (2022), podemos afirmar que, aunque la masa con probióticos tenga un pH inferior al control es igual de imprimible. También se puede destacar que los valores de pH fueron cercanos a la neutralidad, por lo tanto, esto puede ser una de las razones por las que los probióticos no sobrevivían en la masa panaria ya que necesitan un ambiente ácido para su desarrollo (Moreno, 2012).

En las masas elaboradas con levadura panadera se consideraron dos tiempos (T0 correspondiente a 30 minutos de reposo y T2 tras 2 horas de reposo, puesto que la estabilidad de la microbiota láctica podría suponer el alargar el tiempo hasta la impresión). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

TABLA 2. Parámetros fisicoquímicos de las masas con levadura panadera control y con 0,13% LAB (C: control, P: probiótico, T0: tiempo 0, T2: tiempo 2h)

| Muestra | pH | % Humedad | aw |
|---------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| CT0 | 5,76 ± 0,00 ^c | 61,500 ± 0,0003 ^d | 0,982 ± 0,002 ^a |
| CT2 | 5,66 ± 0,03 ^a | 60,010 ± 0,003 ^c | 0,985 ± 0,001 ^a |
| PT0 | 5,860 ± 0,010 ^d | 53,900 ± 0,004 ^b | 0,988 ± 0,001 ^b |
| PT2 | 5,69 ± 0,03 ^b | 52,300 ± 0,007 ^a | 0,988 ± 0,001 ^b |

Las mismas letras indican grupos homogéneos según el ANOVA ($p > 0,05$).

En el caso de la aw la adición de probióticos aumentó ligeramente los valores de aw, no observándose efecto del tiempo de reposo de la masa. Para la humedad ambos factores intervinieron observándose valores más elevados en el caso de las masas control y dentro de estas las que no fueron sometidas a reposo. Cuando se adicionó probiótico se observó un descenso de la humedad más evidente cuando la masa se reposó durante 2h. Esto puede deberse a que la adición de LAB interviene en la retención de agua (León et

al., 2016). Aunque cabe destacar que el efecto del reposo fue mínimo, pero en el caso de la adición de probiótico este fue mucho más evidente. Lo mismo ocurrió en el estudio de Obando et al., (2010), en el cual hubo una reducción de la humedad con respecto al control cuando se adicionaba *L. acidophilus*.

En cuanto al pH las masas con un reposo de 2h siempre presentaron menores valores de pH, esto podría ser debido al proceso de fermentación. Al comparar las masas con y sin probiótico se observó que los valores de pH eran ligeramente superiores en las primeras. Esto se puede deber a que la cantidad de probiótico añadida fue tan baja que la interacción del *L. rhamnosus* y las levaduras no tuvo efecto significativo en la acidificación del medio durante la fermentación, de ahí que las diferencias de pH aunque significativas sean tan pequeñas. Como en el caso de las masas elaboradas con levadura química los valores de pH estuvieron dentro del rango tolerable para la impresión 3 D, los valores de aw fueron algo superiores pero muy cercanos a los obtenidos en el control, por lo que no supone un riesgo a la hora de su utilización.

3.1.3. Comportamiento de los microorganismos probióticos tras el horneado

En la figura 4 se muestran los recuentos de probióticos antes y después del horneado para las masas elaboradas con levadura química. En esta se aprecia un notable descenso de estos tras el proceso de horneado más evidente en el caso de la corteza. En ambos casos los valores obtenidos se alejan mucho de los requeridos para poder considerar el pan como probiótico.

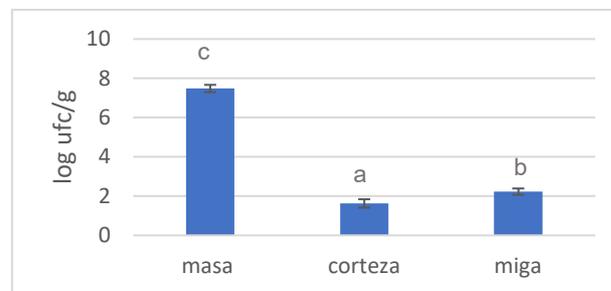


FIGURA 4. Recuentos del probiótico en panes elaborados con levadura química antes del horneado (masa) y después en la miga y la corteza.

Al observarse que en el caso de la levadura química no había apenas supervivencia de los lactobacilos se decidió reducir tanto la temperatura como el tiempo de horneado para intentar garantizar una mayor supervivencia. En la figura 5 se muestran los recuentos en la masa elaborada con levadura panadera (con 30 minutos de reposo T0 y 2 horas T2) y tras el horneado a 180°C durante 20 minutos a nivel de la miga y de la corteza. Al igual que ocurría con los panes elaborados con levadura química tras el horneado se produjo un acusado descenso de los lactobacilos. En el caso de los panes elaborados a partir de masas sin reposo no se observaron diferencias en los recuentos de LAB entre la corteza y la miga. Por lo

contrario, cuando la masa fue sometida a un reposo de 2h sí que se detectaron diferencias, siendo nula la supervivencia en la miga. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Perdana et al. (2013), donde se atribuía la supervivencia de los microorganismos en la corteza a la menor cantidad de humedad presente en la misma. Por lo contrario, en todos los casos la supervivencia de las levaduras fue más elevada que la de los lactobacilos no observándose diferencia entre miga y corteza para cada tiempo.

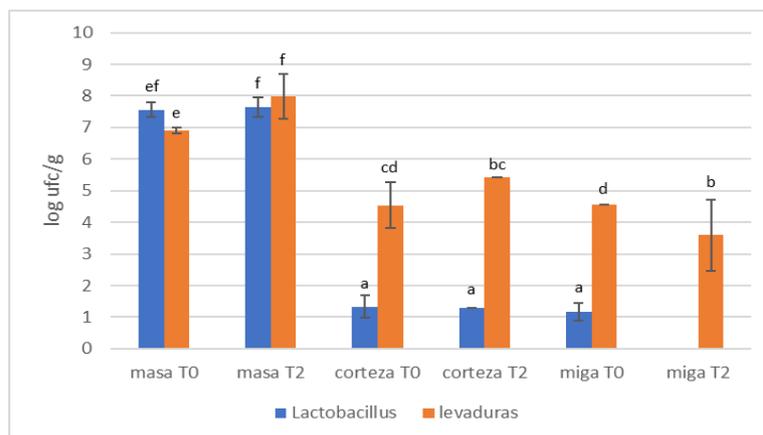


FIGURA 5. Recuentos en panes elaborados con levadura panadera antes del horneado (masa) y después en la miga y la corteza, considerando masas sin reposo T0 y con 2 horas de reposo T2.

3.1.4. Caracterización fisicoquímica de los panes

En la tabla 3 se muestran los resultados para los parámetros fisicoquímicos analizados en los panes elaborados con levadura química, con y sin adición de probiótico. Los valores de a_w , pH y humedad fueron siempre notablemente inferiores en la corteza, tanto para las muestras control como para las adicionadas con probióticos. Estas diferencias pueden atribuirse alta tasa de vaporación de la superficie. A nivel de la corteza, la presencia de probiótico solo afectó a la a_w reduciéndola ligeramente. A nivel de la miga la inclusión de probióticos aumentó los valores de humedad en la miga y redujo los de a_w , no viéndose afectados los valores de pH.

TABLA 3. Parámetros fisicoquímicos de los panes con levadura química control y con 0,13% de probiótico (C: control, m: miga, P: probiótico, c: corteza)

| Muestra | pH | % Humedad | a_w |
|---------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Cm | 7,83 ± 0,02 ^b | 50,600 ± 0,004 ^b | 0,975 ± 0,001 ^d |
| Pm | 7,91 ± 0,06 ^b | 58,300 ± 0,010 ^c | 0,970 ± 0,001 ^c |
| Cc | 5,55 ± 0,04 ^a | 22,500 ± 0,002 ^a | 0,872 ± 0,003 ^b |
| Pc | 5,53 ± 0,17 ^a | 21,900 ± 0,004 ^a | 0,852 ± 0,002 ^a |

Las mismas letras indican grupos homogéneos según ANOVA ($p > 0,05$).

En la tabla 4 se muestran los valores de los parámetros fisicoquímicos en los panes hechos con levadura panadera a tiempo 0 (30 minutos de reposo) y a las 2 horas de reposo (T2), tanto de la masa control como de la masa con 0,13% de probiótico.

Como en el caso de los panes elaborados con levadura química se observaron claras diferencias en todos los parámetros analizado entre la corteza y la miga, obteniéndose siempre valores superiores en esta última. Esto, al igual que en el caso anterior, atribuible al fenómeno de evaporación que se produce en la superficie. En la miga se observó que el contenido de humedad se mantuvo igual en todas las muestras excepto en la correspondiente a la masa control a tiempo 2, lo mismo ocurrió en la corteza. Esto puede explicarse por el fenómeno evaporación-condensación en el interior del pan durante la cocción condensación (Zhang et al., 2018). En cuanto a la aw no cambió de manera significativa en la miga, si lo hizo en la corteza donde varió en cada una de las muestras debido que su mayor exposición al calor. Los valores correspondientes a la aw de las muestras control fueron más elevados que los de las muestras con probiótico tanto a tiempo 0 como a tiempo 2 horas.

TABLA 4. Parámetros fisicoquímicos de los panes con levadura panadera control y con 0,13% de probiótico (C: control, m: miga, P: probiótico, c: corteza, T0: tiempo 0, T2: tiempo 2h)

| Muestra | pH | % Humedad | aw |
|---------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| CmT0 | 6,08 ± 0,00 ^e | 53,100 ± 0,004 ^d | 0,987 ± 0,001 ^e |
| CmT2 | 6,18 ± 0,05 ^f | 46,70 ± 0,04 ^c | 0,982 ± 0,004 ^e |
| PmT0 | 6,30 ± 0,04 ^g | 52,90 ± 0,003 ^d | 0,983 ± 0,001 ^e |
| PmT2 | 6,04 ± 0,06 ^e | 51,80 ± 0,015 ^{cd} | 0,982 ± 0,003 ^e |
| CcT0 | 4,77 ± 0,00 ^a | 17,10 ± 0,00 ^a | 0,877 ± 0,003 ^d |
| CcT2 | 5,20 ± 0,10 ^c | 40,30 ± 0,09 ^b | 0,842 ± 0,006 ^b |
| PcT0 | 5,39 ± 0,03 ^d | 19,100 ± 0,004 ^a | 0,866 ± 0,007 ^c |
| PcT2 | 5,02 ± 0,07 ^b | 16,600 ± 0,003 ^a | 0,814 ± 0,006 ^a |

Las mismas letras indican grupos homogéneos según ANOVA ($p > 0,05$).

En lo referente al pH en la miga se observaron valores más básicos que en la corteza. Tanto en la miga como en la corteza se detectaron diferencias significativas entre las diferentes muestras analizadas sin una clara tendencia. Al comparar los valores de pH con los obtenidos en los panes elaborados con levadura química se observó que estos eran más altos tanto en la miga como en la corteza, para estos últimos. Esto puede ser atribuido a la presencia de la levadura panadera que contribuiría al descenso del pH de la masa. Esto reduciría a su vez el crecimiento de microorganismos patógenos lo cual es beneficioso.

3.1.4. Caracterización textural de los panes

La textura del pan es uno de los aspectos más importantes en cuanto al desarrollo de productos en panificación. Para analizar dicha textura se realizó un ensayo TPA de la miga del pan. Este arroja distintos parámetros que indican las características texturales de dicho pan.

En el caso de los panes elaborados con levadura química (figura 6) no se detectaron diferencias para ninguno de los parámetros analizados en el TPA entre el control y aquellos que contenían probiótico, excepto en la resiliencia siendo mayor en el pan con probiótico. Cabe destacar que en estos panes la miga estaba muy pegada a la corteza y la toma de muestra era muy complicada, especialmente en los elaborados con probiótico, esto tuvo seguramente que interferir en las medidas. Además, el aspecto de los panes no era agradable y no se ajustaba al objetivo perseguido. Esta fue otra de las razones por las que se desechó la utilización de la levadura química para la impresión 3D.

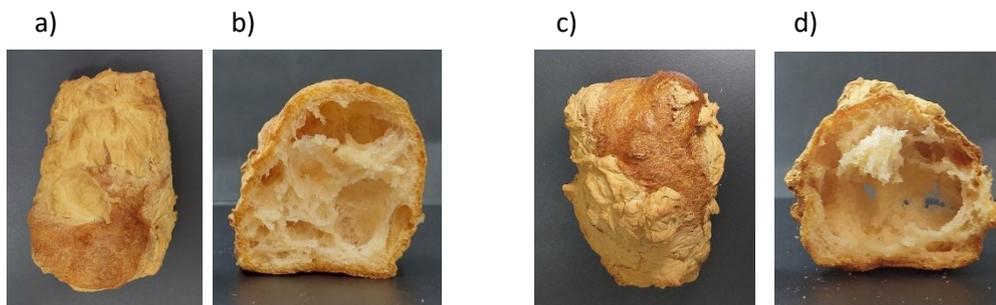


FIGURA 6. Pan elaborado con levadura química a) control vista externa, b) control vista interna, c) con 0,13 % de probiótico vista externa y d) con 0,13 % de probiótico vista interna.

En el caso de los panes elaborados con levadura panadera (figura 7) los resultados se muestran en la tabla 5. Estos indican que cuando se usaba masa sin reposo el único parámetro que se veía modificado por la inclusión de probióticos fue la dureza que aumentó. Para los panes elaborados con masas sometidas a un reposo de 2 horas, la dureza y el resto de los parámetros analizados no variaron respecto al control, pero si la elasticidad que disminuyó.

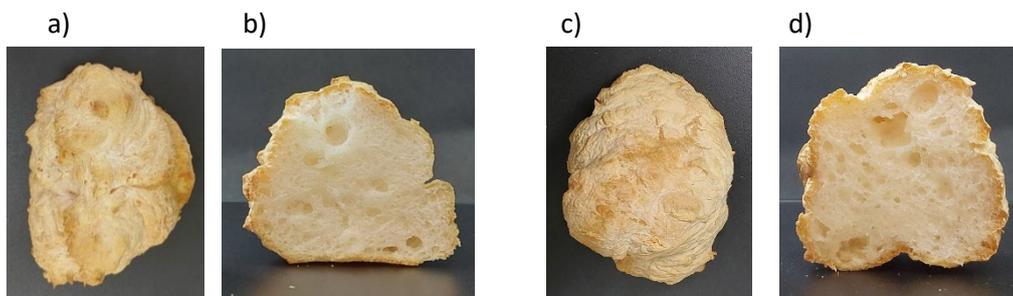


FIGURA 7. Pan elaborado con levadura panadera a) control vista externa, b) control vista interna, c) con 0,13 % de probiótico vista externa y d) con 0,13 % de probiótico vista interna.

TABLA 5. Parámetros del ensayo TPA para el pan con levadura panadera control (C) y con 0,13% de probiótico (P). T0: tiempo 0, T2: tiempo 2h.

| Parámetro | Muestra | | | |
|--------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| | CT0 | CT2 | PT0 | PT2 |
| Dureza (N) | 0,88 ± 0,09 ^c | 0,79 ± 0,05 ^{ab} | 0,970 ± 0,009 ^d | 0,84 ± 0,02 ^{bc} |
| Adhesividad (N·s) | -0,003 ± 0,002 ^a | -0,03 ± 0,04 ^b | -0,056 ± 0,007 ^b | -0,02 ± 0,02 ^b |
| Cohesividad | 0,830 ± 0,009 ^{ab} | 0,84 ± 0,03 ^b | 0,78 ± 0,05 ^a | 0,84 ± 0,03 ^b |
| Elasticidad | 0,95 ± 0,02 ^b | 0,96 ± 0,02 ^b | 0,94 ± 0,04 ^b | 0,84 ± 0,07 ^a |
| Masticabilidad (N) | 0,73 ± 0,08 ^{bc} | 0,67 ± 0,04 ^{ab} | 0,76 ± 0,04 ^c | 0,70 ± 0,03 ^{bc} |
| Resiliencia | 0,500 ± 0,004 ^b | 0,48 ± 0,02 ^b | 0,47 ± 0,04 ^b | 0,52 ± 0,02 ^c |

Las mismas letras indican grupos homogéneos según ANOVA ($p > 0,05$).

Además, se realizó un TPA comparativo entre las masas control con levadura química y panadera cuyos resultados se desecharon al no mostrar diferencias significativas entre los distintos parámetros analizados salvo la resiliencia. Al comparar visualmente las muestras (figura 6 y 7), se puede observar claramente la diferencia en el aspecto de la miga según la levadura utilizada. Cabe mencionar que el pan elaborado con levadura química tenía una miga más pegajosa y dura. Por el contrario, el pan elaborado con levadura panadera presentaba una miga esponjosa y blanquecina propia de un pan comercial.

Además, al comparar visualmente el pan elaborado con levadura panadera con y sin probiótico se detecta un incremento de volumen de la miga lo que coincide con el estudio realizado por Barber et al. (1980) en el cual obtuvieron un volumen mayor cuando combinaban LAB y levaduras en la formulación del pan.

En cuanto a la corteza vemos que el color es más oscuro en el pan con levadura química, esto se debe principalmente a que en ese caso se utilizó un tiempo y una temperatura de horneado mayor que con el pan con levadura panadera.

Puesto, que la utilización de levadura panadera parece ser la más idónea, tecnológicamente y visualmente en lo que respeta a los panes, se procedió a incrementar la concentración de probiótico en la siguiente fase del trabajo, analizando su comportamiento en la masa, modificaciones fisicoquímicas de esta, resistencia al horneado y características del pan resultante.

3.2. FASE II

En una segunda fase se decidió completar el estudio efectuado sobre la levadura panadera incrementando el contenido de probiótico una unidad logarítmica, es decir partiendo de 10^9 ufc/g.

3.2.1 Curvas de crecimiento

En la figura 8 se muestra la evolución de la cepa probiótica y el contenido de levaduras en la masa panaria elaborada con levadura panadera añadiendo 0,98% de LAB.

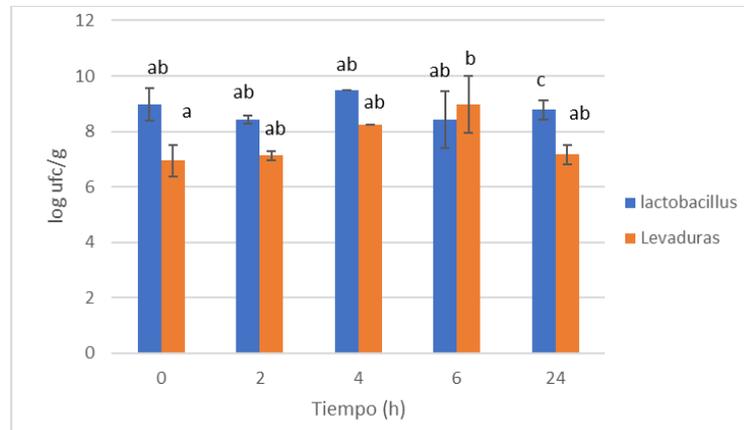


FIGURA 8. Recuentos del probiótico y levaduras en masas elaboradas con levadura panadera y 0,98% de probiótico.

En lo que se refiere a los recuentos de *L. rhamnosus* no se observaron modificaciones a lo largo de las 24 h del estudio, razón por la que no se ha podido modelizar su comportamiento, siendo la media de estos de $8,8 \pm 0,6$ log de ufc/g, lo que garantiza ampliamente el carácter probiótico de las masas panarias. Los valores obtenidos fueron superiores a los de la primera fase ($7,17 \pm 0,08$ ufc/mL). Esto fue debido al incremento de probióticos en la formulación del pan. En cuanto a las levaduras a las 6 horas alcanzaron su máxima concentración. Aunque se detectaron algunas diferencias significativas entre los niveles de levaduras y probióticos se observa que casi van a la par, esto se debe a que conforme aumentan las LAB van liberan compuestos nitrogenados que estimulan su crecimiento (Gobbetti et al., 1994).

3.2.2. Características fisicoquímicas de las masas

En la Tabla 6 aparecen reflejados los valores de pH, humedad y actividad de agua de las muestras de masa obtenidas con levadura panadera, sin probiótico (control), con 0,98% de probiótico a tiempo 0 y tras 2 horas de reposo en todos los casos.

Como se puede observar en cuanto al pH hay diferencias significativas entre los tiempos 0 y 2 de cada una de las muestras siendo en todos los casos más bajo el pH conforme pasa el tiempo como consecuencia de la interacción de LAB y levaduras en el proceso de fermentación. Además, en comparación con la masa elaborada con 0,13% de probiótico posee un menor valor lo que ayudaría a la formación de una miga más suave y palatable (León et al., 2006). En este caso no se observan diferencias significativas entre las muestras con

y sin probióticos para un mismo tiempo de fermentación. Por lo tanto, las diferencias detectadas en la tabla 2 pueden considerarse mínimas, como ya se comentó. Al analizar el porcentaje de humedad, se observó que al aumentar la cantidad de probiótico no se observaron modificaciones en este parámetro respecto a los controles.

En el caso de la actividad de agua no se detectaron diferencias significativas entre los controles y las muestras con 0,98% de probiótico, siendo en ambos casos mayor la aw de las muestras con 2 horas de reposo. No obstante, los valores de aw son muy semejantes entre todas las muestras.

TABLA 6. Parámetros fisicoquímicos de las masas con levadura panadera control y con 0,98% de probiótico (C: control, P: probiótico 0,98%, T0: tiempo 0, T2: tiempo 2h)

| Muestra | pH | % Humedad | aw |
|---------|--------------------------|------------------------------|----------------------------|
| CMT0 | 5,76 ± 0,00 ^b | 61,5 ± 0,0003 ^c | 0,982 ± 0,002 ^a |
| CMT2 | 5,66 ± 0,03 ^a | 60,000 ± 0,003 ^c | 0,985 ± 0,002 ^b |
| PMT0 | 6,0 ± 0,3 ^b | 60,200 ± 0,010 ^c | 0,981 ± 0,002 ^a |
| PMT2 | 5,56 ± 0,10 ^a | 60,500 ± 0,003 ^{cd} | 0,985 ± 0,002 ^b |

Las mismas letras indican grupos homogéneos según el ANOVA ($p > 0,05$).

Estos resultados parecen indicar que la incorporación de 0,98% de probiótico a las masas panarias no conlleva modificaciones de estas respecto al patrón y por lo tanto que estas mantengan intactas sus características de impresión.

3.2.3. Comportamiento de los microorganismos probióticos tras el horneado

En la figura 9 se muestran los resultados de los recuentos de levaduras y lactobacilos tras el horneado.

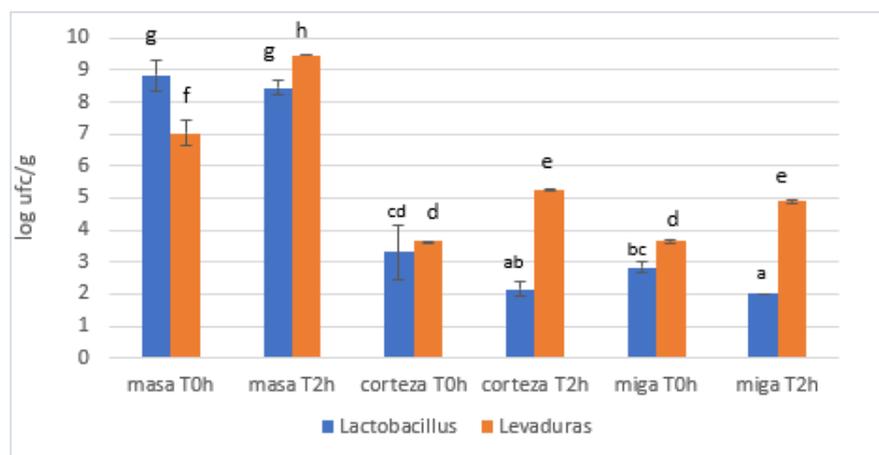


FIGURA 9. Recuento de lactobacillus y levaduras en la masa con levadura panadera con 0,98% de probiótico.

Los resultados muestran diferencias significativas entre los recuentos obtenidos en los panes elaborados con masas sin reposo y con un reposo de 2h. En el caso de los lactobacilos los mayores recuentos se obtuvieron con las masas T0 no existiendo diferencias entre la corteza y la miga. En el caso de las levaduras el comportamiento fue a la inversa los mayores recuentos fueron para las masas reposadas 2h.

Al comparar a su vez los probióticos que resistieron al horneado de las masas con 0,13% y con 0,98%, se detectó un aumento de la supervivencia en el caso de la masa con 0,98% de probiótico, aunque puede deberse principalmente a que partíamos de una masa con una mayor concentración de lactobacilos.

Como ya se observó en la anterior fase del trabajo, tras el horneado la supervivencia de las bacterias probióticas fue mínima, disminuyen entre 6 y 7 unidades logarítmicas en la masa con 0,13% de probiótico y 6 y 5 en la masa con 0,98%, siendo en la masa con 0,98% de probiótico en la que más cantidad de *L. rhamnosus* sobrevivió al final del proceso en la miga ($2,827 \pm 0,181$ log ufc/g a T0 y $2,000 \pm 0$ log ufc/g a T2) y en la corteza ($3,301 \pm 0,851$ log ufc/g a T0 y $2,151 \pm 0,213$ log ufc/g a T2) en comparación con la masa con 0,13% de probiótico en la miga ($1,301 \pm 0$ log ufc/g a T0 y $1,159 \pm 0,275$ log ufc/g a T2) y en la corteza ($1,333 \pm 0,351$ log ufc/g a T0 y 0 log ufc/g a T2). Por lo tanto, cuanto más cantidad de probiótico inicial se añada a la formulación de la masa más cantidad de *L. rhamnosus* sobrevivirá al final del proceso, aunque esto puede producir problemas tecnológicos en el momento de la impresión 3D. Diversos estudios proponen el uso de agentes encapsulantes como alginato y quitosano para asegurar la supervivencia de los microorganismos, como es el caso de Seyedain-Ardabili et al. (2016) en el que obtuvieron un 99,8% de supervivencia utilizando probióticos encapsulados ya que la pared de la encapsulación protege de las altas temperaturas del horneado. En este estudio se adquirieron los microorganismos encapsulados pero los resultados indican que el agente encapsulante no era el adecuado para sobrevivir a las condiciones del proceso de horneado.

3.2.4. Caracterización fisicoquímica de los panes

Al igual que en la anterior Fase I se comparó una vez horneado el pan, los parámetros fisicoquímicos de la miga y la corteza del pan control y la miga y la corteza del pan adicionado con 0,98% a tiempo 0 y a las 2 horas (tabla 7). También con los valores obtenidos para el pan con 0,13% de probiótico (tabla 4).

Como en el caso de los resultados obtenidos en el apartado 3.1.4. se observaron claras diferencias en todos los parámetros analizado para todas las muestras entre la corteza y la miga, obteniéndose siempre valores superiores en esta última. En el caso de la miga se observaron diferencias significativas de pH entre todas las muestras exceptuando la miga con probiótico T2 y la corteza con probiótico T0. En cambio, la humedad de las muestras tanto de la miga como de la corteza no difieren tanto entre sí. Se

pudo observar como es lógico que el menor porcentaje de humedad correspondía a la corteza ya que es la más expuesta al calor en el proceso de horneado y además, los menores valores alcanzados se encontraban en las muestras del pan con 0,13% de probiótico. La aw se mantuvo casi en los mismos valores en todas las muestras de miga, sin embargo, en la corteza hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en todas las muestras analizadas.

TABLA 7. Parámetros fisicoquímicos de los panes con levadura panadera control y con 0,98% de probiótico (C: control, m: miga, P: probiótico 0,98% C: corteza, T0: tiempo 0, T2: tiempo 2h)

| Muestra | pH | % Humedad | aw |
|---------|--------------------------|------------------------------|----------------------------|
| CmT0 | 6,08 ± 0,00 ^e | 53,100 ± 0,004 ^e | 0,987 ± 0,003 ^e |
| CmT2 | 6,18 ± 0,05 ^f | 46,70 ± 0,04 ^e | 0,982 ± 0,005 ^d |
| PmT0 | 6,44 ± 0,02 ^g | 58,800 ± 0,008 ^e | 0,982 ± 0,002 ^e |
| PmT2 | 5,82 ± 0,02 ^d | 58,500 ± 0,006 ^e | 0,986 ± 0,004 ^e |
| CCT0 | 4,77 ± 0,00 ^a | 17,1 ± 0,00 ^b | 0,877 ± 0,010 ^a |
| CCT2 | 5,26 ± 0,10 ^c | 40,30 ± 0,09 ^a | 0,842 ± 0,002 ^c |
| PCT0 | 5,80 ± 0,03 ^d | 28,900 ± 0,0010 ^d | 0,931 ± 0,003 ^b |
| PCT2 | 4,93 ± 0,04 ^b | 23,200 ± 0,010 ^c | 0,887 ± 0,006 ^b |

Las mismas letras indican grupos homogéneos según ANOVA ($p > 0,05$).

3.1.4. Caracterización textural de los panes

Al igual que en la fase I realizamos un análisis de textura del pan con 0,98% de probiótico, en la figura 10 se puede observar visualmente el aspecto que tuvo el pan.

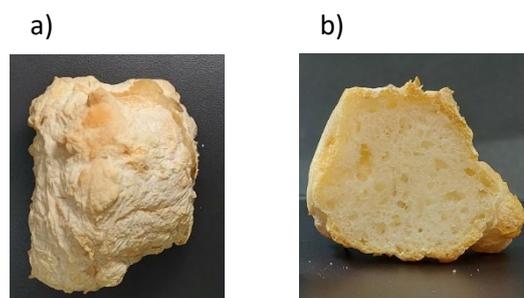


FIGURA 10. Pan elaborado con levadura panadera con 0,98 % de probiótico a) vista externa y b) vista interna.

En la siguiente tabla aparecen los resultados del TPA de la masa panaria elaborada con levadura panadera a tiempo 0 como a tiempo 2 horas del control y de la masa con 0,13% de probiótico y 0,98% de probiótico añadido.

TABLA 8. Parámetros del ensayo TPA del pan con levadura panadera control y con 0,98% de probiótico (CT0/CT2: Masa panadera control tiempo 0/2 horas, PT0/PT2: Masa panadera con 0,98% de probiótico tiempo 0/2 horas)

| Parámetro | Muestra | | | |
|--------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | CT0 | CT2 | PT0 | PT2 |
| Dureza (N) | 0,88 ± 0,09 ^c | 0,79 ± 0,05 ^b | 0,760 ± 0,010 ^a | 1,006 ± 0,002 ^d |
| Adhesividad (N·s) | -0,003 ± 0,002 ^a | -0,03 ± 0,04 ^a | -0,12 ± 0,07 ^b | -0,04 ± 0,02 ^a |
| Cohesividad | 0,830 ± 0,009 ^{ab} | 0,84 ± 0,03 ^b | 0,800 ± 0,010 ^{ab} | 0,84 ± 0,03 ^b |
| Elasticidad | 0,95 ± 0,02 ^b | 0,96 ± 0,02 ^b | 0,84 ± 0,06 ^a | 0,92 ± 0,05 ^{ab} |
| Masticabilidad (N) | 0,73 ± 0,08 ^{bc} | 0,67 ± 0,04 ^{ab} | 0,600 ± 0,007 ^a | 0,84 ± 0,03 ^d |
| Resiliencia | 0,500 ± 0,004 ^b | 0,48 ± 0,02 ^b | 0,290 ± 0,008 ^a | 0,49 ± 0,04 ^b |

Las mismas letras indican los grupos homogéneos según ANOVA ($p < 0,05$).

Al analizar los resultados obtenidos a partir del análisis del TPA se observaron bastantes diferencias en lo que respecta a la dureza. Así, no se detectó un claro efecto de la adición de probiótico ya que los valores más altos y más bajos se correspondieron con muestras con probióticos, PT2 y PT0, respectivamente. Tampoco se observó una clara tendencia respecto a los panes elaborados con 0,13% de probiótico.

En lo referente a la adhesividad únicamente se observaron valores más elevados para las muestras de pan con probióticos elaborados con una masa sin reposo, siendo estos también más elevados que los obtenidos para los panes con 0,13% de probióticos.

En cuanto a la cohesividad o relación entre las áreas originadas en los dos ciclos de compresión observamos que no hay diferencias significativas entre las muestras.

La elasticidad fue un parámetro que también varió con la incorporación de probiótico, pero únicamente en el caso de los panes elaborados con masa sin reposo previo para concentraciones de probiótico de 0,98% y para los elaborados con masas sin reposo para concentraciones de 0,13%.

Los valores de masticabilidad no presentaron una tendencia definida asociada a la incorporación de probióticos en la masa cuando la dosis utilizada fue de 0,98%, contrariamente a lo que ocurría con concentraciones de 0,13%. Sin embargo, el menor valor lo encontramos cuando añadimos 0,98% de probiótico a T0, este sería el pan nos costaría un menor número de masticaciones para poder deglutirlo.

Por último, los valores correspondientes a la resiliencia nos indican que ambas masas exceptuando la PT0 tardan lo mismo en recuperar la figura inicial tras las deformaciones

De la valoración visual de los panes (figura 10) se observa una mayor homogeneidad en el aspecto de la miga cuando se utiliza una concentración de probiótico de 0,98%.

3. CONCLUSIONES

La incorporación de *L. rhamnosus* de masas panarias elaboradas con levadura química y en base a la formulación testada en este trabajo presenta una serie de inconvenientes. Por un lado, el probiótico perdura muy poco tiempo en ellas, debido principalmente a la falta de nutrientes y alas características fisicoquímicas que presenta esta formulación; lo que reduce el tiempo para su utilización en la impresión 3D. Por otro lado, el pan obtenido tras el horneado no presenta las características texturales ni visuales perseguidas.

Cuando el microorganismo probiótico utilizado en este trabajo se incorpora a masas formuladas con levadura panadera, debido a la interacción probiótico-levadura se obtienen niveles estables de este, lo que posibilita el uso de las masas para la impresión durante más tiempo. Además, los panes horneados presentan características que se ajustan perfectamente al objetivo perseguido que no es otro que lograr un pan que visualmente se asemeje a uno comercial.

En todos los casos el proceso del horneado produce un drástico descenso de la población de microorganismos probióticos, aunque este es ligeramente menor cuando mayor es la carga de probiótico en la masa panaria. Al no ser viable tecnológicamente aumentar más la carga en probiótico sería necesario buscar otras alternativas tales como la encapsulación de este o la adición de algún prebiótico a la masa panaria para mejorar la viabilidad y resistencia térmica de las bacterias probióticas

5. REFERENCIAS

- Adedeji, O. E., Okechie, I. D., & Ezekiel, O. O. (2022). Prebiotic influence of baobab pulp on the stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in white-pan bread. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(3), 2221-2228.
- Álvarez, J., Real, J. M. F., Guarner, F., Gueimonde, M., Rodríguez, J. M., de Pípaon, M. S., & Sanz, Y. (2021). Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterología y Hepatología*, 44 (7), 519-535.
- Arepally, D., & Goswami, T. K. (2019). Effect of inlet air temperature and gum arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *Lwt*, 99, 583–593.
- Arrieta, M. C., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E. M. , & Finlay, B. (2014). The intestinal microbiome in early life: Health and disease. *Frontiers in Immunology*, 5, 427.
- Baranyi, J. & Roberts, T.A. (1994): A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23. 277-294.
- Bustos Estrada, A. I. (2017). *Sobrevivencia De L. Plantarum En Pan Vegano Adicionado Con Crotalaria Longirostrata*.
- Castillo-Escandón, V., Fernández-Michel, S. G., Cueto-Wong, M. C., & Ramos-Clamont Montfort, G. (2019). Criterios y estrategias tecnológicas para la incorporación y supervivencia de probióticos en frutas, cereales y sus derivados. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22.

- de Barber, C. B., Barber, S., & Planells, V. (1980). La masa madre panaria: su influencia sobre las características reológicas y fermentativas de la masa de harinas panificables. *Revista de agroquímica y tecnología de alimentos*, 20(3), 403-411.
- FAO. 2002. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio FAO alimentación y nutrición.
- Fekri, A., Torbati, M., Khosrowshahi, A. Y., Shamloo, H. B., & Azadmard-Damirchi, S. (2020). Functional effects of phytate-degrading, probiotic lactic acid bacteria and yeast strains isolated from Iranian traditional sourdough on the technological and nutritional properties of whole wheat bread. *Food chemistry*, 306, 125620
- Ghasemi, L., Nouri, L., Mohammadi Nafchi, A., & Al-Hassan, A. A. (2022). The effects of encapsulated probiotic bacteria on the physicochemical properties, staling, and viability of probiotic bacteria in gluten-free bread. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(3), e16359.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., & Rossi, J. (1994). The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 456-460.
- Handa, C., Goomer, S., & Siddhu, A. (2012). Physicochemical properties and sensory evaluation of fructoligosaccharide enriched cookies. *Journal of food science and technology*, 49, 192-199.
- Hu, H., Shao, W., Liu, Q., Liu, N., Wang, Q., Xu, J., ... & Gu, A. (2022). Gut microbiota promotes cholesterol gallstone formation by modulating bile acid composition and biliary cholesterol secretion. *Nature Communications*, 13(1), 252.
- Jin, M., Qian, Z., Yin, J., Xu, W., & Zhou, X. (2019). The role of intestinal microbiota in cardiovascular disease. *Journal of cellular and molecular medicine*, 23(4), 2343-2350.
- Lactibiane ATB - Descripción, Consejos de utilización, Composición - Productos PiLeJe.* (s.f.). Todos los productos del laboratorio PiLeJe - Sitio oficial - Productos PiLeJe. Recuperado el 24/03/2023 <https://productos.pileje.es/producto/lactibiane-atb>
- León, Á. M., Montoya, O. I., Motato, K. E., Granda, D. M., Caro, C. A., Restrepo, J. M., & Quinchía, L. (2006). Bacterias ácido lácticas (BAL) silvestres colombianas presentan propiedades adecuadas para la fabricación de masa ácida. *Vitae*, 13(2), 26-35.
- Mariné M, Farre C, Alsina M, Vilar P, Cortijo M, Salas A, et al. The prevalence of coeliac disease is significantly higher in children compared with adults. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2011, Feb;33(4):477–86.
- Matas, A., Igual, M., García-Segovia, P., & Martínez-Monzó, J. (2022). Application of 3D Printing in the Design of Functional Gluten-Free Dough. *Foods*, 11(11), 1555.
- Obando, M., Brito, C. S., SCHÖBITZ, R. P., Baez, L. A., & Horzella, M. Y. (2010). Viabilidad de los microorganismos probióticos *Lactobacillus casei* 01, *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* BB12 durante el almacenamiento de queso cottage. *Vitae*, 17(2), 141-148.
- Perdana, J., Bereschenko, L., Fox, M. B., Kuperus, J. H., Kleerebezem, M., Boom, R. M., & Schutyser, M. A. (2013). Dehydration and thermal inactivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Comparing single droplet drying to spray and freeze drying. *Food Research International*, 54(2), 1351-1359.
- Rivera-Espinoza, Y., & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food microbiology*, 27(1), 1-11.
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M., ... & Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(9), 649-667.
- Seyedain-Ardabili, M., Sharifan, A., & Ghiassi Tarzi, B. (2016). The production of synbiotic bread by microencapsulation. *Food technology and biotechnology*, 54(1), 52-59.
- Tilg, H., Zmora, N., Adolph, T. E., & Elinav, E. (2020). The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 20(1), 40-54.
- Vijaya Kumar, B., Vijayendra, S. V. N., & Reddy, O. V. S. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. *Journal of food science and technology*, 52, 6112-6124.

- Wang, X. Q., Zhang, A. H., Miao, J. H., Sun, H., Yan, G. L., Wu, F. F., & Wang, X. J. (2018). Gut microbiota as important modulator of metabolism in health and disease. *RSC advances*, 8(74), 42380-42389.
- Xiao, R., Luo, G., Liao, W., Chen, S., Han, S., Liang, S., & Lin, Y. (2022). Association of human gut microbiota composition and metabolic functions with *Ficus hirta* Vahl dietary supplementation. *npj Science of Food*, 6(1), 45.
- Yao, M., Xie, J., Du, H., McClements, D. J., Xiao, H., & Li, L. (2020). Progress in microencapsulation of probiotics: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 857-874.
- Zannini, E., Pontonio, E., Waters, D. M., & Arendt, E. K. (2012). Applications of microbial fermentations for production of gluten-free products and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 93, 473-485.
- Zhang, L., Lou, Y., & Schutyser, M. A. (2018). 3D printing of cereal-based food structures containing probiotics. *Food structure*, 18, 14-22.
- Zhang, L., Taal, M. A., Boom, R. M., Chen, X. D., & Schutyser, M. A. (2018). Effect of baking conditions and storage on the viability of *Lactobacillus plantarum* supplemented to bread. *LWT*, 87, 318-325.