



FACULTAD *de* CIENCIAS EXACTAS *y* NATURALES
.....
UNIVERSIDAD NACIONAL *de* MAR DEL PLATA

TESIS DOCTORAL

INTERACCION ENTRE COMPUESTOS
BIOACTIVOS DE MIEL Y PROTEINAS DE
GLUTEN

Lic. Julia Nutter

Director: Dra. Amelia I. Saiz

Co-director: Dra. M. Alejandra Grela

2018

Resumen

Las bacterias ácido lácticas (BAL), además de contribuir a la estructura, textura y aroma de masas ácidas mejoran la calidad nutricional y promueven efectos beneficiosos para la salud de los consumidores. En el presente trabajo se estudió el efecto de cuatro cepas de BAL sobre la microestructura y estructura secundaria y terciaria de las proteínas de gluten de masas ácidas con y sin agregado de miel. Durante la fermentación, la acidificación producida por las BAL, junto con la actividad de enzimas endógenas de cereales, produce la hidrólisis de las proteínas e inducen modificaciones en su microestructura y sobre las conformaciones de sus proteínas. En todas las masas fermentadas, la proporción relativa de estructuras β -sheet se incrementó, principalmente, en detrimento de la conformación α -hélice. La actividad fermentativa de *L. bulgaricus* y *P. pentosaceus* se caracterizó por promover el desplegamiento de las proteínas y, por una configuración β -sheet antiparalela que duplicó al valor obtenido en el gluten nativo. Esta conformación resultó en una microestructura dispuesta espacialmente como una red interconectada de fibras de espesor variable. *L. plantarum*, presentó la pendiente de acidificación más pronunciada y las proteínas de gluten adquirieron una microestructura laminar. En todas las masas fermentadas, la estructura terciaria de las proteínas estuvo caracterizada por una disminución de la banda disulfuro, respecto del gluten nativo. En particular, *L. fermentum* experimentó la mayor disminución en la intensidad de esta banda. Coincidente con este resultado, la microestructura adquirió un aspecto discontinuo y poco cohesivo. Sin embargo, la suplementación de estas masas con miel mejoró significativamente su cohesividad, resultando en una matriz hiperconectada de proteína.

INDICE

CAPITULO I: INTRODUCCION	1
1. Antecedentes	2
2. Hipótesis	5
3. Objetivos	
3.1. Objetivo general	6
3.2. Objetivos particulares	6
CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS	7
1. Muestras de miel	8
1.1. Caracterización fisicoquímica	8
1.1.1. Contenido de humedad	8
1.1.2. pH y acidez total titulable (TTA)	9
1.1.3. Actividad enzimática glucosa oxidasa (GOX)	9
1.1.4. Actividad enzimática diastasa	10
1.2. Capacidad de mieles para generar y secuestrar radicales hidroxilo	11
1.2.1. Preparación de soluciones de miel	11
1.2.2. Capacidad para generar radicales hidroxilo endógenos	11
1.2.3. Capacidad para secuestrar radicales hidroxilo exógenos	14
2. Bacterias ácido lácticas (BAL)	15
2.1. Descripción de cepas	15
2.2. Preparación de inóculos	16
2.3. Conservación de cepas	16
3. Cinética de crecimiento y perfil fermentativo de BAL en masas	17
3.1. Preparación de masas y condiciones de incubación	17
3.2. Actividad GOX en masas suplementadas con miel	18
3.3. Cinética de crecimiento de BAL	18
3.4. Perfil de acidificación. pH y TTA	19
4. Microestructura de masas ácidas	19
4.1. Preparación de la muestra	19
4.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	20
5. Cambios conformacionales en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas de gluten	20
5.1. Preparación de la muestra	20
5.2. Espectroscopia Raman	21
5.2.1. Banda Amida I	22
5.2.2. Banda disulfuro	23
5.2.3. Aminoácidos aromáticos	23

6. Análisis estadísticos	24
CAPITULO III: CAPACIDAD DE MIELES PARA GENERAR Y SECUESTRAR RADICALES HIDROXILO	25
1. Introducción	
1.1. Mieles como fuente de compuestos bioactivos	26
2. Resultados	
2.1. Caracterización fisicoquímica de mieles	28
2.2. Capacidad para generar radicales hidroxilo endógenos	29
2.3. Capacidad para secuestrar radicales hidroxilo exógenos	32
3. Conclusiones	35
CAPITULO IV: CINETICA DE CRECIMIENTO Y PERFIL FERMENTATIVO DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS	36
1. Introducción	
1.1. BAL	37
1.2. Metabolismo fermentativo de BAL	38
1.3. BAL como fermentadoras de masas ácidas	41
2. Resultados	
2.1. Actividad GOX en masas suplementadas con miel	43
2.2. Cinética de crecimiento de BAL en masas	43
2.3. Perfil fermentativo de BAL en masas	46
3. Conclusiones	51
CAPITULO V: MICROESTRUCTURA DE MASAS ACIDAS	52
1. Introducción	
1.1. Microestructura de masas ácidas	53
1.2. Proteínas de gluten	53
1.2.1. Gliadinas	56
1.2.2. Gluteninas	57
1.3. Efecto de enzimas endógenas de cereales sobre el macropolímero de gluten (MPG)	59
2. Resultados	
2.1. Efecto de BAL sobre la microestructura de masas ácidas	61
2.1.1. <i>Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus</i>	62
2.1.2. <i>Lactobacillus fermentum</i>	63
2.1.3. <i>Lactobacillus plantarum</i>	65

2.1.4. <i>Pediococcus pentosaceus</i>	66
2.2. Efecto de BAL sobre la microestructura de masas con miel	69
2.2.1. <i>L. bulgaricus</i>	71
2.2.2. <i>L. fermentum</i>	72
2.2.3. <i>L. plantarum</i>	73
2.2.4. <i>P. pentosaceus</i>	74
3. Conclusiones	76
CAPITULO VI: CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA SECUNDARIA Y TERCIARIA DE LAS PROTEINAS DE GLUTEN	77
1. Introducción	
1.1. Proteínas. Estructura primaria y secundaria	78
1.2. Espectroscopia Raman	85
1.2.1. Estructura secundaria de las proteínas de gluten. Banda Amida I	86
1.2.2. Estructura terciaria de las proteínas de gluten. Bandas disulfuro y aminoácidos aromáticos	88
2. Resultados	
2.1. Cambios conformacionales en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas de gluten	90
2.1.1. Estructura secundaria de las proteínas de gluten en masas fermentadas por BAL	92
2.1.2. Estructura secundaria de proteínas de gluten en masas fermentadas por BAL y suplementadas con miel	100
2.1.2.1. <i>L. bulgaricus</i>	102
2.1.2.2. <i>L. fermentum</i>	104
2.1.2.3. <i>L. plantarum</i>	105
2.1.2.4. <i>P. pentosaceus</i>	106
2.1.3. Estructura terciaria de las proteínas de gluten	108
2.1.3.1. Banda disulfuro	108
2.1.3.1.1. Efecto de BAL	108
2.1.3.1.2. Efecto de miel	112
2.1.3.1.3. Efecto de BAL en masas suplementadas con miel	114
2.1.3.2. Banda triptofano y doblete de tirosina	116
3. Conclusiones	119
CAPITULO VII: CONCLUSIONES	120
BIBLIOGRAFIA	125
ANEXO DE TABLAS	138

ANEXO DE ESPECTROS RAMAN

143

ANEXO DE SOLUCIONES

145

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestras de miel estudiadas	8
Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de mieles	29
Tabla 3. Intervalos de frecuencia de los elementos que componen la estructura secundaria de las proteínas	88
Tabla 4. Intensidad normalizada de banda triptofano y tirosina	118
Tabla 5. Recuentos de BAL, valores de pH y TTA en masas fermentadas por BAL	138
Tabla 6. Proporción relativa de elementos de estructura secundaria de proteínas de gluten	140
Tabla 7. Intensidad de banda disulfuro	142

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inducción del estado energético de espín	12
Figura 2. Estructura química del DMPO	13
Figura 3. Aducto DMPO-OH. Estructura y cuarteto de líneas	13
Figura 4. Mecanismo de generación de radicales libres en néctar	27
Figura 5. Reacciones catalizadas por glucosa oxidasa (GOX) y catalasa	30
Figura 6. Capacidad para generar radicales hidroxilo	31
Figura 7. Capacidad para secuestrar radicales hidroxilo	33
Figura 8. Ruta metabólica homofermentativa	38
Figura 9. Ruta metabólica heterofermentativa	40
Figura 10. Recuentos de BAL en masas	44
Figura 11. Recuentos de BAL en masas con miel	45
Figura 12. pH y TTA de masas fermentadas por BAL	47
Figura 13. pH y TTA de masas con miel y fermentadas por BAL	48

Figura 14. Modelo de viscoelasticidad loops and trains	55
Figura 15. Clasificación de las proteínas de gluten	57
Figura 16. Esquema de la estructura del MPG	58
Figura 17. Micrografías SEM de masa control	61
Figura 18. Micrografías SEM de masas fermentadas con <i>L. bulgaricus</i>	63
Figura 19. Micrografías SEM de masas fermentadas con <i>L. fermentum</i>	65
Figura 20. Micrografías SEM de masas fermentadas con <i>L. plantarum</i>	66
Figura 21. Micrografías SEM de masas fermentadas con <i>P. pentosaceus</i>	68
Figura 22. Micrografías SEM de masas con miel	70
Figura 23. Micrografías SEM de masas con miel fermentadas con <i>L. bulgaricus</i>	71
Figura 24. Micrografías SEM de masas con miel fermentadas con <i>L. fermentum</i>	72
Figura 25. Micrografías SEM de masas con miel fermentadas con <i>L. plantraum</i>	73
Figura 26. Micrografías SEM de masas con miel fermentadas con <i>P. pentosaceus</i>	74
Figura 27. Estructura de un aminoácido	78
Figura 28. Formación e hidrólisis del enlace peptídico	79
Figura 29. Mecanismo de formación de enlaces disulfuro	80
Figura 30. Estructura α -hélice	81
Figura 31. Tipos de interacciones moleculares en proteínas	82
Figura 32. Estructura β -sheet	84
Figura 33. Estructura β -turn	84
Figura 34. Espectro Raman de gluten nativo	91
Figura 35. Deconvolución de Banda Amida I	92
Figura 36. Proporciones relativas de elementos de estructura secundaria en proteínas de masas control	93
Figura 37. Proporciones relativas de elementos de estructura secundaria en	

proteínas de masas fermentadas por BAL	94
Figura 38. Proporciones relativas de conformaciones que experimentaron cambios significativos en proteínas de masas fermentadas por BAL	95
Figura 39. Proporciones relativas de las configuraciones β -antiparalela y β -paralela en proteínas de masas fermentadas por BAL	98
Figura 40. Esquema de la estructura de las configuraciones β -antiparalela y β -paralela	99
Figura 41. Micrografía SEM de masas fermentadas con <i>L. bulgaricus</i> y <i>P. pentosaceus</i>	99
Figura 42. Proporciones relativas de elementos de estructura secundaria en proteínas de masas con miel	101
Figura 43. Proporciones relativas de elementos de estructura secundaria en proteínas de masas con miel fermentadas con <i>L. bulgaricus</i>	103
Figura 44. Proporciones relativas de elementos de estructura secundaria en proteínas de masas con miel fermentadas con <i>L. fermentum</i>	104
Figura 45. Proporciones relativas de elementos de estructura secundaria en proteínas de masas con miel fermentadas con <i>L. plantarum</i>	105
Figura 46. Proporciones relativas de elementos de estructura secundaria en proteínas de masas con miel fermentadas con <i>P. pentosaceus</i>	106
Figura 47. Conformaciones de enlaces disulfuro	109
Figura 48. Espectro Raman centrado a 480 cm^{-1} (banda disulfuro) de masas fermentadas con BAL	110
Figura 49. Micrografía SEM de masa fermentada con <i>L. fermentum</i>	111
Figura 50. Espectro Raman centrado a 480 cm^{-1} de masas con miel	112
Figura 51. Mecanismo de acción de GOX	113
Figura 52. Micrografía SEM de masa con miel	113
Figura 53. Espectro Raman centrado a 480 cm^{-1} de masas con miel fermentadas con BAL	115
Figura 54. Actividad enzimática de proteasas endógenas de cereales y GOX	115
Figura 55. Eventos desarrollados en una masa fermentada por BAL y suplementada con miel	124

Figura 56. Espectros Raman de proteínas de masas fermentadas por BAL	143
Figura 57. Espectros Raman de proteínas de masas con miel y fermentadas con BAL	144

CAPITULO I

INTRODUCCION

1. Antecedentes

Los alimentos a base de cereales constituyen un componente esencial en la dieta humana, siendo el trigo uno de los cultivos más cosechados a nivel mundial (Ferri y col., 2016). En la actualidad existe una demanda creciente hacia alimentos funcionales a base de cereales de elevada calidad nutricional (Aponte y col., 2014). En este sentido, la harina de centeno aporta fibras fácilmente fermentables, consideradas prebióticos para la microflora intestinal, incrementando la biomasa bacteriana saludable (Olagnero y col., 2007). Por su parte, la harina de trigo es ampliamente utilizada en la elaboración de masas panificables, debido a las propiedades viscoelásticas únicas aportadas por el gluten, la fracción proteica mayoritaria de esta matriz alimentaria. Esta característica hace de la harina de trigo un ingrediente irremplazable en la elaboración de numerosos alimentos (Rizzello y col., 2013) y convierte al gluten en un modelo ideal que permite evaluar el efecto de distintos agentes sobre la estructura de estas proteínas (Rasiah y col., 2005).

Por otra parte, las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido ampliamente utilizadas en la fermentación de numerosos alimentos con la intención de mejorar su valor nutricional. Estos microorganismos han sido empleados como probióticos y modificadores de las propiedades organolépticas de los alimentos, actuando sobre el sabor y flavour de los mismos. En el caso de una masa panificable, las BAL cumplen un papel crucial en la elaboración de masas ácidas, y actúan modificando el contenido de compuestos bioactivos y aromáticos e impactan sobre el valor nutricional, así como sobre las propiedades reológicas y funcionales que definen a estos productos (Ferri y col., 2016; Aponte y col., 2014).

Tradicionalmente, se han utilizado compuestos químicos y enzimas purificadas como mejoradores de propiedades viscoelásticas en productos panificados, que actúan principalmente sobre el entrecruzamiento o *crosslinking* de las proteínas de gluten (Bonet y col., 2006). Debido a la creciente tendencia hacia la incorporación de ingredientes naturales a los alimentos, en el presente trabajo se considera la miel como un potencial mejorador de productos panificados, ya sea actuando sobre la red proteica como sobre la actividad de BAL fermentadoras de estos sistemas. La miel representa una fuente de compuestos bioactivos, como enzimas, ácidos fenólicos, compuestos flavonoides y carotenoides, conocidos por presentar propiedades antioxidantes, eficaces en la neutralización de radicales libres, así como también por presentar actividad antibacteriana. Estos compuestos no sólo juegan un papel importante en la salud humana, sino también en la prevención o retraso de los procesos oxidativos que modifican las características de los alimentos (Gheldof, y col., 2002).

A partir de estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación se conoce que ciertas BAL modifican las propiedades reológicas de masas de trigo-centeno en forma distintiva, dependiendo de su cinética de acidificación. En particular la elasticidad es la propiedad funcional más importante de una masa panificable, sin embargo, los procesos proteolíticos llevados a cabo por las BAL suelen afectar negativamente la reología del sistema. En el presente trabajo se propuso estudiar los mecanismos moleculares responsables de esas modificaciones, mediante el estudio de la microestructura y de las conformaciones secundaria y terciaria de las proteínas de gluten. Además, se evaluaron los cambios moleculares que pueden ser inducidos por el agregado de una matriz rica en compuestos bioactivos como la miel. De esta manera pueden seleccionarse las BAL más

apropiadas para un proceso específico, y/o promover determinadas cualidades con el agregado de aditivos.

2. Hipótesis

Las masas ácidas consisten en un sistema sumamente complejo en el cual ocurren numerosos eventos de manera simultánea. La acidificación producida por BAL afecta la actividad de las enzimas presentes y, en consecuencia, el grado de hidrólisis del macropolímero de gluten. Por lo tanto, las BAL inducen cambios conformacionales de las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas, las cuales son particulares del perfil fermentativo de cada especie. Asimismo, la suplementación de masas con miel tiene un efecto sobre la actividad de BAL y representa un ingrediente capaz de inducir transformaciones sobre las proteínas de gluten.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Relacionar los cambios producidos en la microestructura del macropolímero de gluten y en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas con la actividad de diferentes especies de BAL y con los compuestos bioactivos presentes en la miel.

3.2. Objetivos particulares

- I. Evaluar la capacidad de la miel para generar y secuestrar radicales libres.
- II. Estudiar el efecto de la miel sobre la cinética de crecimiento y perfil fermentativo de BAL en masas ácidas.
- III. Estudiar los cambios microestructurales en las proteínas de gluten inducidos por actividad fermentativa de BAL y por componentes bioactivos presentes en la miel.
- IV. Estudiar los cambios moleculares en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas de gluten inducidos por la actividad fermentativa de BAL y por componentes bioactivos presentes en la miel.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras de miel

En el presente trabajo se estudiaron cinco muestras de miel, cuatro de ellas provenientes de la provincia de Buenos Aires y la restante, de la provincia de San Luis (Tabla 1). Las muestras fueron cosechadas durante el período 2013-2015, y una vez remitidas al laboratorio se almacenaron a 4 °C protegidas de la luz hasta su análisis.

Tabla 1. Muestras de miel estudiadas. Origen geográfico y botánico.

Muestra	Provincia de origen	Especie vegetal predominante
M1	San Luis	<i>Prosopis</i> spp.
M2	Buenos Aires	<i>Trifolium</i> spp.
M3	Buenos Aires	<i>Eucalyptus</i> spp.
M4	Buenos Aires	<i>Trifolium</i> spp.

1.1. Caracterización fisicoquímica de mieles

1.1.1. Determinación del contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó utilizando el método indirecto o refractométrico. En el cual, los sólidos presentes en la matriz producen una desviación de la luz monocromática, medida a través del índice de refracción de la muestra. Para efectuar estas mediciones se utilizó el Refractómetro de Abbe (A.O.A.C., 1990). El refractómetro fue previamente calibrado con agua bidestilada, ajustando el índice de refracción hasta un valor

de 1,333. Las mieles líquidas se midieron de forma directa, mientras que aquellas parcialmente cristalizadas se fundieron previamente en Baño María, sin exceder los 60 °C, de manera de evitar la caramelización de los azúcares. Las mediciones se realizaron colocando una gota de cada muestra entre los prismas limpios y secos del refractómetro y se efectuó la lectura. Las lecturas del índice de refracción se convirtieron en porcentaje de humedad (% p/p) mediante la tabla de correlación de Chataway, completada por Wedmore (Bianchi, 1990).

1.1.2. Determinación de pH y Acidez Total Titulable

La determinación de acidez se efectuó por potenciometría, midiendo pH y acidez total titulable (TTA) de las muestras. Se transfirieron muestras de 10 g de miel a un vaso de precipitado conteniendo 75 ml de agua desionizada descarbonatada, las cuales fueron homogeneizadas durante 10 min utilizando un agitador magnético. Sobre esta solución se midió el valor de pH, utilizando un pH-metro (Hanna Instruments HI 9321). La TTA se evaluó por neutralización con NaOH 0,1 M hasta pH 8,1. La acidez total es la suma de la acidez libre y láctica. Los resultados se expresaron en miliequivalentes de NaOH/kg miel (meq NaOH/kg).

1.1.3. Actividad enzimática glucosa oxidasa

La enzima glucosa oxidasa (GOX) cataliza la oxidación de la glucosa presente en una solución de miel produciendo ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Este último, oxida al yoduro de potasio (IK) produciendo yodo (I₂), el cual se encuentra en

solución como triyoduro (I_3^-). El I_2 forma con el almidón un complejo color azul, evidenciando la presencia de la enzima (Bianchi, 1990).

La actividad GOX se determinó cualitativamente, disolviendo 1 g de miel en un tubo conteniendo 1 ml de solución buffer fosfato pH 6,5 y 9 ml de agua desionizada. La solución se incubó a 37 °C durante 1 h. En tubos de ensayo se colocaron los siguientes reactivos en el orden especificado a continuación: 2,5 ml IK 3% (p/v), 0,3 ml de solución de la muestra, 3 gotas de solución de almidón 0,1% (p/v). Los tubos se incubaron a 37 °C durante 10 min y se observó la coloración de la solución.

1.1.4. Actividad enzimática diastasa

En la determinación de la actividad diastasa, una solución de almidón se inocula con la muestra, produciéndose la hidrólisis enzimática, la cual se determina mediante el agregado de una solución de I_2 . Este último, forma un complejo color azul con el remanente de almidón no hidrolizado. La disminución del color producida en la solución, con respecto a un testigo, es una medida de la actividad diastásica de la muestra. Esta actividad se expresa en escala Gothe; normalmente deberán obtenerse valores entre 64 y 128 unidades de diastasa (U.D.) Cantidades menores a 64 U.D. corresponden a una miel calentada, mal procesada o adulterada (Bianchi, 1990).

La actividad diastasa se determinó semicuantitativamente, disolviendo 2 g de miel en 1 ml de buffer acetato pH 5,3. Se prepararon 10 tubos de ensayo numerados del 1 al 9, se agregó a cada tubo 1 ml de solución de NaCl 1% (p/v) y en el primer tubo se transfirió 1 ml de la solución de miel. A partir de esta solución se realizaron diluciones sucesivas (1:2) hasta el noveno tubo. El décimo tubo fue empleado como control negativo, sin agregado de muestra. Luego, se agregó 1 ml de solución de almidón 0,05 % (p/v) a cada tubo y se

incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Los tubos se enfriaron rápidamente, se agregó una gota de solución de trabajo de I₂ y se observó la coloración desarrollada. Los resultados se expresaron como unidades de diastasa (U.D.) = dilución mayor que permanece incolora x 2.

1.2. Capacidad de mieles para generar y secuestrar radicales hidroxilo

La capacidad de mieles para generar y secuestrar o neutralizar especies radicales libres se evaluó mediante espectroscopía de resonancia paramagnética de espín (EPR).

La espectroscopía EPR es una técnica basada en la absorción de radiación electromagnética y es la única técnica analítica que puede detectar de manera específica radicales libres, es decir especies que poseen un único electrón ocupando un orbital.

Una molécula o átomo posee estados discretos, o separados, cada uno con una correspondiente energía. La espectroscopía es la medida e interpretación de las diferencias energéticas entre los estados atómicos o moleculares. Esas diferencias de energía, ΔE , pueden ser medidas dado que existe una relación proporcional entre ΔE y la absorción de radiación electromagnética, siguiendo la ley de Plank:

$$\Delta E = h\nu$$

Donde h es la constante de Plank y ν es la frecuencia de la radiación, que en el caso de la espectroscopía EPR tiene unidades de Gigahertz. La absorción de energía produce la transición de un estado de menor a otro de mayor energía. Las diferencias de energía estudiadas en este tipo de espectroscopía se deben a la interacción entre electrones desapareados de la muestra con un campo magnético producido por el imán del espectrómetro EPR. Los electrones poseen un espín, es decir, un momento angular

intrínseco del electrón aislado. Al aplicar un campo magnético externo, los electrones se orientan en dirección paralela o antiparalela con respecto a la dirección del campo magnético, B_0 , (Fig. 1). Este campo proporciona una energía potencial magnética que divide los estados de espín en una cantidad proporcional al campo magnético, a este comportamiento se lo llama efecto Zeeman. Para permitir la transición de un estado de espín a otro debe existir un campo magnético externo con la fuerza apropiada. Con este propósito, se barre el campo magnético externo, mientras que la muestra se expone a una radiofrecuencia fija de microondas. Cuando el campo magnético y la radiofrecuencia “coinciden” producen una absorción conocida como condición de resonancia (Pan y Nigles, 2014).

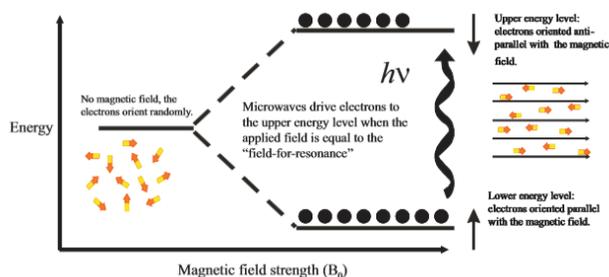


Fig. 1. Inducción del estado energético de espín en función del campo magnético B_0 .

1.2.1. Preparación de soluciones de miel

Con el objetivo de evaluar la capacidad de generación y secuestro de radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), se prepararon soluciones de miel 50% (p/v) disolviendo las muestras en buffer fosfato pH 6,5 (preparado según se detalla en el anexo de soluciones). Para evaluar la contribución de azúcares presentes en la miel, se preparó una miel artificial 80% (p/v). Para esta solución, se disolvieron 40 g de fructosa, 30 g de glucosa, 8 g de maltosa y 2 g de sacarosa en agua bidestilada, se transfirió a matraz y se enrasó a 100 ml.

1.2.2. Capacidad para generar radicales hidroxilo endógenos

Cuando una miel es diluida, la enzima GOX presente en esta matriz cataliza la oxidación de glucosa en δ -gluconolactona y H_2O_2 . El H_2O_2 puede descomponerse en

radicales $\text{OH}\cdot$, una de las especies reactivas de oxígeno (EROs), capaz de inducir y propagar reacciones de oxidación a través de un mecanismo por radicales libres.

En mieles, la formación de radicales $\text{OH}\cdot$ a partir de H_2O_2 puede ser inducida por medio de la reacción de Fenton, la cual se produce al agregar una solución de FeSO_4 a la muestra. Los radicales $\text{OH}\cdot$ son especies altamente reactivas con

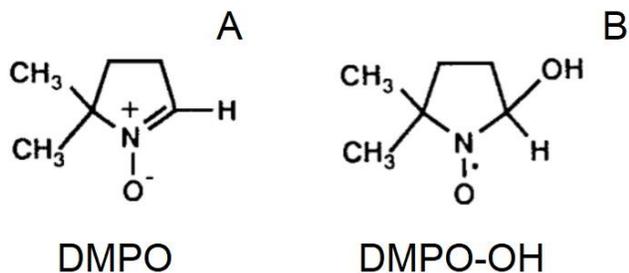


Fig. 2. Estructuras químicas de (A) DMPO, (B) DMPO-OH.

tiempos de vida media cortos; por esta razón se utilizó el spin trap 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), el cual forma con los radicales $\text{OH}\cdot$ un aducto paramagnéticamente estable y detectable, el DMPO-OH \cdot (Fig. 2). Esta especie produce un cuarteto de líneas característico (1:2:2:1) con una constante de acoplamiento hiperfina de $a_{\text{N}}=a_{\text{H}}=15$ Gauss (G), que posibilita su identificación (Makino y col., 1992) (Fig. 3).

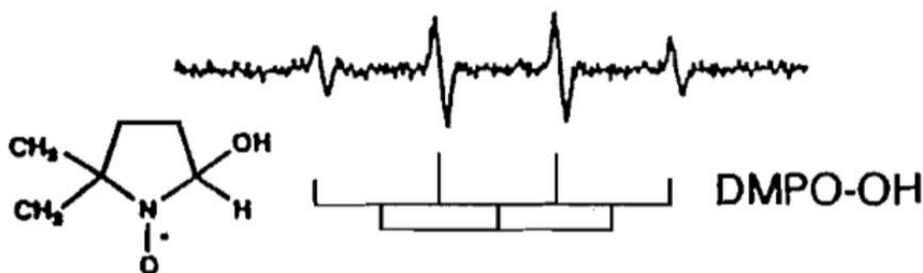


Fig. 3. Aducto DMPO-OH. Estructura química y cuarteto de líneas 1:2:2:1 característico en los espectros EPR (Makino y col., 1992).

Con el propósito de evaluar la presencia de radicales hidroxilo endógenos en muestras de miel, se prepararon soluciones de miel 50% (p/v) de acuerdo a 2.1. Las soluciones se incubaron a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, de manera de favorecer la producción

de H_2O_2 por acción de la enzima GOX. Los radicales $\text{OH}\cdot$ se determinaron de acuerdo al protocolo llevado a cabo por Henriques y col. (2006), con algunas modificaciones. Se adicionaron 40 μl de DMPO 0,1 M a 10 μl de solución de miel 50% (p/v) y, luego de su homogeneización, se agregaron 20 μl de FeSO_4 0,002 M. La solución se transfirió a un tubo capilar para EPR y se procedió a su medición en espectrómetro EPR Bruker ER 200-X band (Bruker Analytische Masstechnik GMBN, Alemania), operando a una frecuencia de microondas de 9.2 GHz y 20 mW. El rango de escaneos fue de 100 Gauss (G), tiempo de escaneo 120 segundos y modulación de campo de 1,0 G.

1.2.3. Capacidad para secuestrar radicales hidroxilo exógenos

La capacidad de muestras de miel para secuestrar radicales $\text{OH}\cdot$ se evaluó mediante espectroscopía EPR. Con tal objetivo, se dosaron soluciones de miel 50% (p/v) (10 μl) con 30 μl de H_2O_2 30% (v/v). Luego, se adicionaron 40 μl de DMPO 0,1 M y 20 μl de FeSO_4 0,002 M. Como control positivo se mezclaron los reactivos como fue indicado anteriormente exceptuando el agregado de la solución de miel. Para preparar el control negativo, se procedió del mismo modo que para el control positivo, pero con el agregado de una solución de catalasa de hígado bovino (450U/mg de proteína, C9322, Sigma Aldrich), de manera de producir la descomposición de H_2O_2 en oxígeno e hidrógeno molecular. La capacidad de secuestro o neutralización de radicales hidroxilo se determinó midiendo la disminución en la señal de los espectros EPR con respecto al control positivo.

2. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) componen un diverso grupo de organismos Gram-positivos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, carentes de motilidad y catalasa negativos. Son cocos y bacilos de longitud variable y de espesor 0,5-0,8 μm (Parra-Huertas, 2010).

2.1. Descripción de las cepas

En este trabajo se utilizaron cuatro cepas de BAL: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (CRL 494), *Lactobacillus fermentum* (CRL 220), *Pediococcus pentosaceus* (CRL 922) y *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). Las primeras tres cepas fueron provistas por el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA, San Miguel de Tucumán, Argentina). *L. bulgaricus* es una especie de forma bacilar homofermentativa obligada. No presenta las enzimas necesarias para fermentar sacarosa ni maltosa y, al igual que la mayor parte de las BAL homofermentativas, es incapaz de fermentar pentosas (Weiss, 1983). *L. fermentum* es un bacilo que fermenta hexosas a través de la vía heterofermentativa, con la concomitante producción de ácido láctico, ácido acético y dióxido de carbono (CO_2). Es capaz de hidrolizar maltosa, mediante la enzima maltosa fosforilasa, para formar glucosa y glucosa-1-fosfato. Además, puede utilizar fructosa como aceptor alternativo de electrones, generando manitol (Stolz y col., 1995). *L. plantarum* es un bacilo heterofermentativo facultativo, que metaboliza las hexosas formando, principalmente, ácido láctico. Al igual que la mayoría de las especies heterofermentativas es capaz de fermentar pentosas a ácido láctico y ácido acético. *P. pentosaceus*, a diferencia del resto de las cepas estudiadas, se presenta en forma de cocos de 0,6-1,0 μm de diámetro agrupados formando tétradas. En medios ricos en carbohidratos exhibe un patrón de fermentación homoláctico, es decir, metaboliza las hexosas generando dos moles de ácido láctico utilizando la vía Embden-

Meyerhoff-Parnas (Dobrogosz y Stone, 1962). Bajo ciertas condiciones son capaces de formar diacetilo. Asimismo, fermentan las pentosas a cantidades equimolares de ácido acético y ácido láctico (Fukui y col., 1957).

2.2. Preparación de inóculos de BAL

Se partió de cepas de BAL conservadas en glicerol 80% (p/v) y mantenidas a -20°C en tubos Eppendorf. De manera de asegurar la recuperación de las cepas luego de haber sido sometidas a la condición de estrés del congelamiento, las cepas se inocularon individualmente en caldo de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Merk, Alemania) y se incubaron a 32 °C durante 19 h. Con el objetivo de obtener cultivos en la fase exponencial de crecimiento, cada cepa se transfirió a un tubo conteniendo 9 ml caldo MRS y fueron incubadas a 32 °C durante 19 h. Luego, las BAL fueron aisladas en agar MRS, y nuevamente inoculadas e incubadas en caldo MRS a 32 °C por 19 h. Finalizado el período de incubación, el número de células se estandarizó en la escala 0,5 de turbidez McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml). Para ello, el cultivo joven fue inoculado en 10 ml NaCl 0,85 % (p/v) hasta obtener la turbidez deseada. Finalmente, se procedió a la centrifugación de los inóculos en centrífuga (ALC, PK 121, Pévy, Francia) a 4500 rpm durante 10 min. Las células se resuspendieron dos veces en solución fisiológica (0,85% p/v NaCl) y la suspensión final se utilizó en la inoculación de las masas.

2.3. Conservación de las cepas

Con el objetivo de conservar las cepas para futuros estudios, las colonias aisladas en agar MRS (2.2.) se preservaron utilizando glicerol 80% como crioprotector. De esta

manera, cuatro colonias de cada cepa, aisladas en agar MRS, fueron individualmente repicadas en 9 ml de caldo MRS e incubadas a 32 °C por 19 h. Alícuotas de 870 µl de cada cultivo se transfirieron a tubos Eppendorf de 1,5 ml, conteniendo 130 µl de glicerol 80% (p/v). Luego de ser homogeneizados, los inóculos se conservaron a -20 ° C.

3. Cinética de crecimiento y perfil fermentativo de BAL en masas

Los cambios en la población de BAL y en la acidez de masas con y sin suplementación de miel de *Prosopis* spp. se evaluaron a cuatro intervalos de tiempo, 0 (t_0), 6 (t_6), 12 (t_{12}), y 19 (t_{19}) h, desde el inicio del período fermentativo.

3.1. Preparación de masas y condiciones de incubación

El sistema motivo de estudio consistió en masas preparadas a partir de 125 g de harina de trigo, 125 g de harina de centeno, 150 ml de agua desionizada, 3,8 g de NaCl y 9 ml de la suspensión estandarizada de BAL (preparada de acuerdo a **2.2.**). Asimismo, y con el objeto de evaluar el efecto de la miel sobre el crecimiento y capacidad fermentativa de las BAL, se prepararon, bajo las mismas condiciones, una serie de masas con miel en una concentración final de 6,5% (p/p). Como control se elaboró una masa de trigo-centeno (1:1) sin microorganismos agregados. Se mezclaron todos los ingredientes en una amasadora industrial marca Hobart N-50 (Ontario, Canadá) y las masas se incubaron a 35 °C. Teniendo en cuenta que los cultivos iniciadores comerciales requieren entre 16 y 20 h de crecimiento en la masa para que ésta alcance un valor de pH aproximadamente 4, se eligió un período de 19 horas de fermentación. A intervalos de 0 (t_0), 6 (t_6), 12 (t_{12}) y 19 h (t_{19}) se tomaron muestras para su posterior análisis.

3.2. Actividad glucosa oxidasa en masas suplementadas con miel

De manera de evaluar la actividad GOX en masas de trigo-centeno (1:1) suplementadas con miel e inoculadas con BAL, se transfirieron muestras de 10 g de cada masa, preparadas de acuerdo a **3.1.** a un vaso de precipitado conteniendo 10 ml de solución buffer fosfato pH 6,5 y 80 ml de agua desionizada descarbonatada, para ser homogeneizadas durante 10 min utilizando un agitador magnético. Se transfirieron 10 ml de esta suspensión a un tubo de ensayo, y se incubó a 37 °C durante 1 h. En tubos de ensayo se colocaron los siguientes reactivos en el orden especificado a continuación: 5 ml IK 3% (p/v), 0,6 ml de suspensión de la muestra y 6 gotas de solución de almidón 0,1% (p/v). Los tubos se incubaron a 37 °C durante 10 min y se observó la coloración de la solución. El desarrollo de una coloración azul fue considerado un resultado GOX positivo.

3.3. Cinética de crecimiento de BAL

Para evaluar el crecimiento de las cepas de BAL en la masa durante el período fermentativo se utilizó el método de recuento en placa. Para ello, se transfirieron aseptícamente muestras de 10 g de cada masa, preparadas de acuerdo a **3.1** a un Erlenmeyer conteniendo 90 ml de solución fosfatada de Butterfileld (0,25 M KH_2PO_4 ajustado a pH 7,2 con NaOH, Butterfield, 1932) estéril. Teniendo en cuenta que el inóculo adicionado a las masas presenta una concentración de, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC/ml se realizaron diluciones seriadas al décimo. Las muestras fueron sembradas en profundidad transfiriendo 1 ml de 3 diluciones sucesivas a placas de Petri estériles y vertiendo 9 ml de agar MRS, previamente fundido y templado a 45 °C. La incubación de las placas se produjo anaeróticamente a 32 °C durante 48 h. Los resultados se expresaron como logaritmo de UFC/g de masa (Log UFC/g).

3.4. Perfil de acidificación. pH y TTA

El seguimiento del metabolismo fermentativo de las BAL se evaluó mediante la acidificación producida en los sistemas utilizando técnicas potenciométricas: determinación de pH y TTA. Para ello, se transfirieron muestras de 10 g de cada masa a un vaso de precipitado conteniendo 90 ml de agua desionizada descarbonatada, para ser homogeneizadas durante 10 min utilizando un agitador magnético Precytec, AE-28 (Capital Federal, Argentina). La concentración de protones de cada una de las muestras fue evaluada midiendo el valor de pH, utilizando un pH-metro (Hanna Instruments HI 9321). Sobre la misma suspensión se determinó la TTA, por neutralización con NaOH 0,1 M hasta pH 8,1. Los resultados se expresaron como ml NaOH/10 g de masa.

4. Microestructura de masas ácidas

Las modificaciones inducidas por la actividad fermentativa de BAL y por el agregado de miel sobre la microestructura de masas ácidas fueron estudiadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). La microestructura de las masas se estudió a 0 (t_0), 6 (t_6), 12 (t_{12}) y 19 h (t_{19}) desde el inicio de la incubación.

4.1. Preparación de la muestra

Con el objetivo de estudiar los cambios producidos sobre la microestructura de masas ácidas, se prepararon masas de acuerdo a lo expuesto en **3.1**. De manera de minimizar la alteración de la microestructura, se extrajo una porción interna de 40 g de cada masa, y se congeló por inmersión en aire líquido (-80 °C). Finalmente, las muestras se

liofilizaron en liofilizador VIRTIS, Benchtop SLC (Pensilvania, E.E.U.U). para reducir el contenido de humedad de las mismas a menos de 20% (p/p).

4.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las muestras liofilizadas se fracturaron de manera de dejar expuesta su superficie interior. Luego, se adhirieron a un soporte y se cubrieron con una capa de oro-paladio. Las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico de barrido marca Jeol, JSM 6460 LV (Miami, E.E.U.U.) a 500-2200 aumentos.

5. Cambios conformacionales en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas de gluten

El efecto de la actividad de BAL y de miel sobre la estructura secundaria y terciaria de las proteínas de gluten se estudió mediante espectroscopía Raman.

5.1. Preparación de la muestra de gluten

Para el estudio de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas de gluten, se prepararon muestras de masas ácidas de acuerdo a lo indicado en **3.1**. De cada muestra, se retiraron porciones internas de 40 g, las cuales fueron lavadas con agua desionizada hasta conseguir la eliminación de almidón y proteínas solubles, prevaleciendo el macropolímero de gluten (MPG). Las muestras se congelaron por inmersión en aire líquido (-80 °C) y se liofilizaron, de manera de reducir su contenido de humedad a un 20% (p/p), en liofilizador VIRTIS, Benchtop SLC (Pensilvania, E.E.U.U.). Luego, fueron pulverizadas

en mortero y almacenadas en desecador. La obtención de los espectros Raman se realizó dentro de las 48 h desde la preparación de las muestras.

5.2. Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es un tipo de espectroscopía vibracional derivada de un proceso de dispersión de luz inelástica. Por medio de esta técnica un fotón láser es dispersado por una molécula de la muestra y pierde, o gana energía durante el proceso. La cantidad de energía perdida se ve como un cambio en la energía (longitud de onda) del fotón irradiador y es característica de un enlace particular en la molécula. Por medio de la espectroscopía Raman se obtiene una “huella digital” espectral precisa, exclusiva de una molécula o incluso de una estructura molecular individual. De carácter complementario a la espectroscopía infrarroja (IR), la espectroscopía Raman puede ser utilizada para observar modos vibracionales que son de intensidad débil en el espectro IR. En particular, ha demostrado ser eficaz en la caracterización de compuestos no polares, con anillos aromáticos en su estructura y con dobles y triples enlaces (Holder, 2012). Los espectros Raman de polipéptidos y proteínas exhiben bandas características, convirtiendo a esta técnica en una herramienta fundamental para monitorear cambios en la estructura de proteínas alimentarias. El enlace peptídico presenta 9 bandas, siendo las bandas Amida I y Amida III las de mayor importancia para el estudio de la estructura secundaria de las proteínas. Adicionalmente, esta técnica posibilita la caracterización de las conformaciones de los enlaces disulfuro, el grado de exposición de los residuos aromáticos de los aminoácidos y el involucramiento en la formación de puentes de hidrógeno por parte de grupos fenol y de residuos tirosina de los aminoácidos (Gómez y col., 2013).

Los espectros Raman se registraron utilizando un Espectrometro inVie (Renishaw, UK) equipado con un dispositivo de carga acoplado (CCD) y detector de 1040 x 256 pixeles.

La fuente de excitación consistió en un láser diodo de 785 nm (300 mW). Los espectros se tomaron en el rango 120-3500 cm^{-1} , con una resolución de 6 cm^{-1} y se graficaron como Intensidad relativa, en unidades arbitrarias (U.A), versus Frecuencia (cm^{-1}). El análisis de los espectros fue llevado a cabo por medio de la técnica descrita por Gómez y col (2013). En ella, los espectros se normalizaron a la intensidad de banda de la fenilalanina. Se ha reportado que ni la ubicación ni la intensidad de banda fenilalanina son sensibles a los cambios conformacionales; por este motivo es utilizada como referencia interna para la normalización de los espectros Raman (Ellepola y col., 2006).

5.2.1. Banda Amida I

Con el objetivo de conocer la contribución de cada componente de la estructura secundaria de las proteínas, la banda Amida I se ajustó y truncó en el intervalo 1570-1720 cm^{-1} , para ser sometida a un proceso matemático de deconvolución, utilizando Origin (versión 9,0 Pro, OriginLab Corporation, USA). Los intervalos de frecuencia de los elementos que componen la estructura secundaria de las proteínas fueron asignadas según Gómez y col. (2013): β -sheet paralela (1607-1625 cm^{-1}), hélice solvatada (1625-1637 cm^{-1}) *random coil* (1637-1645 cm^{-1}), α -hélice (1650-1658 cm^{-1}), β -turn (1666-1673 cm^{-1}) y β -sheet antiparalela (1675-1695 cm^{-1}). Finalmente, se calculó el porcentaje (%) de cada elemento de la estructura secundaria de las proteínas, calculado como el cociente entre el área bajo la curva de cada componente y el área total bajo la curva Amida I. El valor obtenido fue considerado como la proporción relativa de la cadena polipeptídica que se presenta en dicha conformación.

5.2.2. Banda disulfuro

El estudio de las conformaciones que pueden adoptar los enlaces disulfuro se evaluó mediante un análisis directo de los estiramientos vibracionales de este enlace ($450-545\text{ cm}^{-1}$), el que brinda información acerca de la estructura terciaria de las proteínas. Se estudiaron tanto la ubicación como la intensidad de la banda disulfuro. Los diferentes modos vibracionales de las proteínas considerados en este trabajo fueron: gauche-gauche-gauche ($450-515\text{ cm}^{-1}$), gauche-gauche-trans ($515-525\text{ cm}^{-1}$), trans-gauche-trans ($535-545\text{ cm}^{-1}$) (Gómez y col., 2013; Van Wart, 1986).

5.2.3. Aminoácidos aromáticos

Con el objetivo de obtener información adicional acerca de la estructura terciaria de las proteínas del gluten, se estudiaron los microambientes asociados a los aminoácidos aromáticos, tirosina y triptófano. De manera de conocer el grado de exposición de los residuos tirosina, se calculó el cociente entre las intensidades de banda correspondientes a las vibraciones del anillo fenólico en la tirosina, localizadas a 850 y 830 cm^{-1} ($I_{850/830}$). $I_{850/830}$ (doblete de tirosina) es un indicador de la naturaleza de los puentes de hidrógeno y del estado de ionización del grupo hidroxilo presente en el anillo fenólico. Por otra parte, se estudió la intensidad de banda correspondiente a triptófano (760 cm^{-1}), la cual aporta información adicional sobre los cambios conformacionales de las proteínas a través del grado de hidrofobicidad del anillo indólico (Gómez y col., 2013).

6. Análisis estadísticos

Todos los resultados presentados en este trabajo representan los valores promedios \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. En los casos en los que fue posible, los resultados fueron analizados mediante el programa de Análisis Estadístico Discriminante SPSS para Windows versión 11.5.0. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con comparación de las medias, mediante la prueba de rango múltiple de Tukey, con un nivel de significancia de 0,05.

CAPÍTULO III

CAPACIDAD DE MIELES PARA GENERAR Y SECUESTRAR RADICALES HIDROXILO

1. Introducción

1.1 Componentes bioactivos en mieles

La miel ha sido ampliamente estudiada por sus propiedades nutricionales y antibacterianas. Se trata de una matriz compleja, constituida mayoritariamente por azúcares simples, principalmente fructosa y glucosa en una concentración de, en promedio, de 38 y 31%, respectivamente. Asimismo posee un amplio rango de compuestos minoritarios, muchos de los cuales son conocidos por poseer propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Estos compuestos incluyen ácidos fenólicos y flavonoides, ácido ascórbico, productos de la reacción de Maillard, aminoácidos, proteínas y ciertas enzimas (glucosa oxidasa, catalasa) que pueden modificar el metabolismo bacteriano (Gheldof y col., 2002; Küçük y col., 2007). Las características fisicoquímicas de las mieles varían de acuerdo con la vegetación de la cual las abejas extraen el néctar, y con las condiciones geoclimáticas donde se encuentra la misma. Estos factores condicionan el color, humedad, acidez y contenido de enzimas presentes en las mieles (Iurlina, 2011).

La actividad antimicrobiana de la miel es atribuida principalmente al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cuya capacidad oxidante produce daños en biomoléculas y células. Este compuesto es producido por la enzima glucosa oxidasa (GOX), activa en esta matriz cuando la miel es diluida. En presencia de oxígeno molecular, cataliza la oxidación de la glucosa para formar δ -gluconolactona y H_2O_2 . La producción de H_2O_2 es máxima cuando la miel se encuentra en solución en concentraciones entre 30 % y 50% (p/v) (Bang y col., 2003). Otros compuestos diferentes a los peróxidos que contribuyen a la actividad antimicrobiana de la miel son los ácidos fenólicos y flavonoides. Además, estos compuestos, junto a péptidos, productos de la reacción de Maillard, ácidos orgánicos y enzimas, son responsables de la capacidad antioxidante de mieles. (Taormina y col., 2001;

Al-Mamary y col., 2002; Al-Waili, 2004; Molan y col., 1992; Bogdanov, 1997). Asimismo, ha sido reportado el efecto benéfico de la miel sobre el crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL) (Shamala y col., 2000). Estos autores encontraron que soluciones de miel entre 1 y 9% (p/v) promueven el crecimiento de *L. plantarum* y *L. acidophilus*. En tanto que, concentraciones de miel de 6,5% (p/v) no solo mejoran el crecimiento de *L. fermentum* y *P. pentosaceus*, sino que también incrementan la biodisponibilidad de compuestos fenólicos y flavonoides presentes en la solución (Nutter y col., 2016).

De esta manera, una matriz tan compleja como la miel puede servir como fuente de compuestos antioxidantes, hábiles en atrapar y eliminar especies reactivas de oxígeno (EROs), o bien como una fuente de compuestos pro-oxidantes, promoviendo su generación (Isla y col. 2011, Kishore y col., 2011). En este sentido, la miel es un sistema donde compiten ambos mecanismos, pro- y antioxidante, predominando uno u otro efecto de

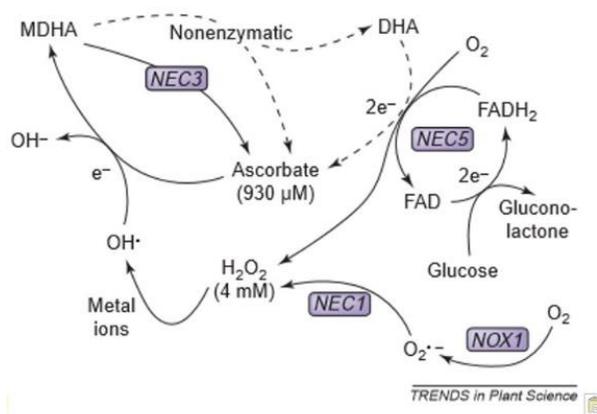


Fig. 4. Mecanismo de generación de radicales libres en néctar (Carter y Thornburg, 2004). MDH: monodehidroascorbato; DHA: dehidroascorbato.

acuerdo a su composición enzimática y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides. Así, la miel puede utilizarse como un aditivo modificador de otros sistemas.

La producción natural de peróxidos en la miel puede conducir a la formación de radicales libres como hidroxilo (OH•) y superóxido (O₂•), cuya generación se ejemplifica en la Fig. 4 en el néctar de las flores, precursor de la miel. Las especies radicales libres pueden ser detectadas mediante espectroscopía de resonancia paramagnética de spin (EPR).

En este sentido, se propone evaluar la capacidad de la miel para generar y secuestrar radicales libres.

2. Resultados

2.1. Caracterización fisicoquímica de mieles

Se realizó la caracterización fisicoquímica de mieles, las cuales fueron, luego, evaluadas en su capacidad de generación y secuestro de radicales hidroxilo. Las muestras, provenientes de la provincia de San Luis (M1) y de la provincia de Buenos Aires (M2-4), fueron evaluadas en su contenido de humedad, pH, acidez total titulable (TTA) y actividad de enzimas GOX y diastasa (Tabla 2). Todas las muestras presentaron un contenido de humedad que se corresponde al de una miel madura (<18% p/v). Las muestras presentaron elevada actividad diastasa, reflejando el perfil enzimático de una miel que no ha sido calentada a una temperatura superior a 70 °C, temperatura que inactiva la enzima. Por otra parte, los resultados de actividad GOX mostraron que la muestra M2 fue sometida a un tratamiento térmico superior a 58 °C e inferior a 70 °C; sin embargo, suficiente como para inactivar la GOX.

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de mieles provenientes de la provincia de San Luis (M1) y de la provincia de Buenos Aires (M2-4).

Determinación Muestra	Color	Humedad (%)	pH	Acidez total (ml NaOH 0,1 M)	Actividad GOX	Actividad diastasa (U.D.)
M1	Ámbar oscuro	16,0	3,9	31,9	Positiva	128
M2	Ámbar claro	15,4	4,14	26,1	Negativa	128
M3	Ámbar claro	16,2	4,04	23,9	Positiva	516
M4	Ámbar claro	14,6	4,12	27,9	Positiva	128

2.2. Capacidad para generar radicales hidroxilo endógenos

Las muestras de miel se evaluaron en su capacidad para producir radicales $\text{OH}\cdot$ a partir de H_2O_2 , presente en la miel como producto de la actividad GOX. Con tal objetivo, se prepararon soluciones de miel 50% (p/v), teniendo en cuenta que la máxima producción de H_2O_2 ocurre en soluciones de concentración entre 30 y 50% (p/v) (Bang y col., 2003). En estas soluciones se indujo la reacción de Fenton mediante el agregado de FeSO_4 0,002 M

y se adicionó una solución del spin trap 5,5-dimetil-1-pirrolina-óxido (DMPO). Finalmente, se detectó la formación de la especie paramagnética estable DMPO-OH, que genera en los espectros EPR un cuarteto de líneas 1:2:2:1 característico. En la Fig. 6 se muestran los espectros EPR de los controles positivos (Fig. 6 A), negativos (Fig. 6 B) y de las muestras de miel estudiadas (Figs. 6 C-F). En el espectro del control positivo, H₂O₂ 30% (p/v), se observó el cuarteto de líneas característico del radical OH•, identificado en base a sus constantes hiperfinas de acoplamiento (a_N= 15G, a_H= 15G, Makino y col., 1992). En tanto que, para la miel artificial (control negativo) no se observó ninguna señal en el espectro, evidenciando la ausencia de especies radicales libres.

De las cuatro muestras estudiadas sólo las muestras M1 y M3 presentaron el cuarteto característico en el espectro EPR, y según las constantes hiperfinas de acoplamiento, éste corresponde al radical OH•. Adicionalmente, la muestra M1 exhibió una señal de 6 líneas, identificada como radical metilo (•CH₃) (a_N= 16,3G, a_H= 23G). Henriques y col. (2006) han sugerido que éste sería el resultado de reacciones secundarias entre radicales OH• y compuestos orgánicos presentes en la miel.

La ausencia de especies radicales en la muestra M2 es consistente con la ausencia de GOX (Tabla 2). Sin embargo, la ausencia de radicales OH• en la muestra M4 no implica necesariamente la ausencia de H₂O₂ en la muestra; de hecho, la enzima GOX se encontró activa. La prevalencia de H₂O₂ y radicales OH• en una solución de miel es el resultado del balance entre las actividades

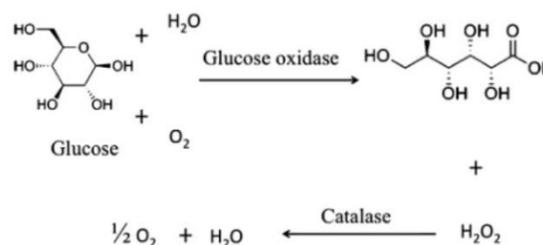


Fig. 5. Reacciones catalizadas por las enzimas GOX y catalasa (Tian y col.,

opuestas de generar y destruir H₂O₂ por parte de las enzimas GOX y catalasa, respectivamente (Fig. 5). Simultáneamente, los compuestos con actividad antioxidante

(ácidos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico) son capaces de secuestrar EROs (Henriques y col., 2006), alterando la concentración radicales OH• presentes en mieles.

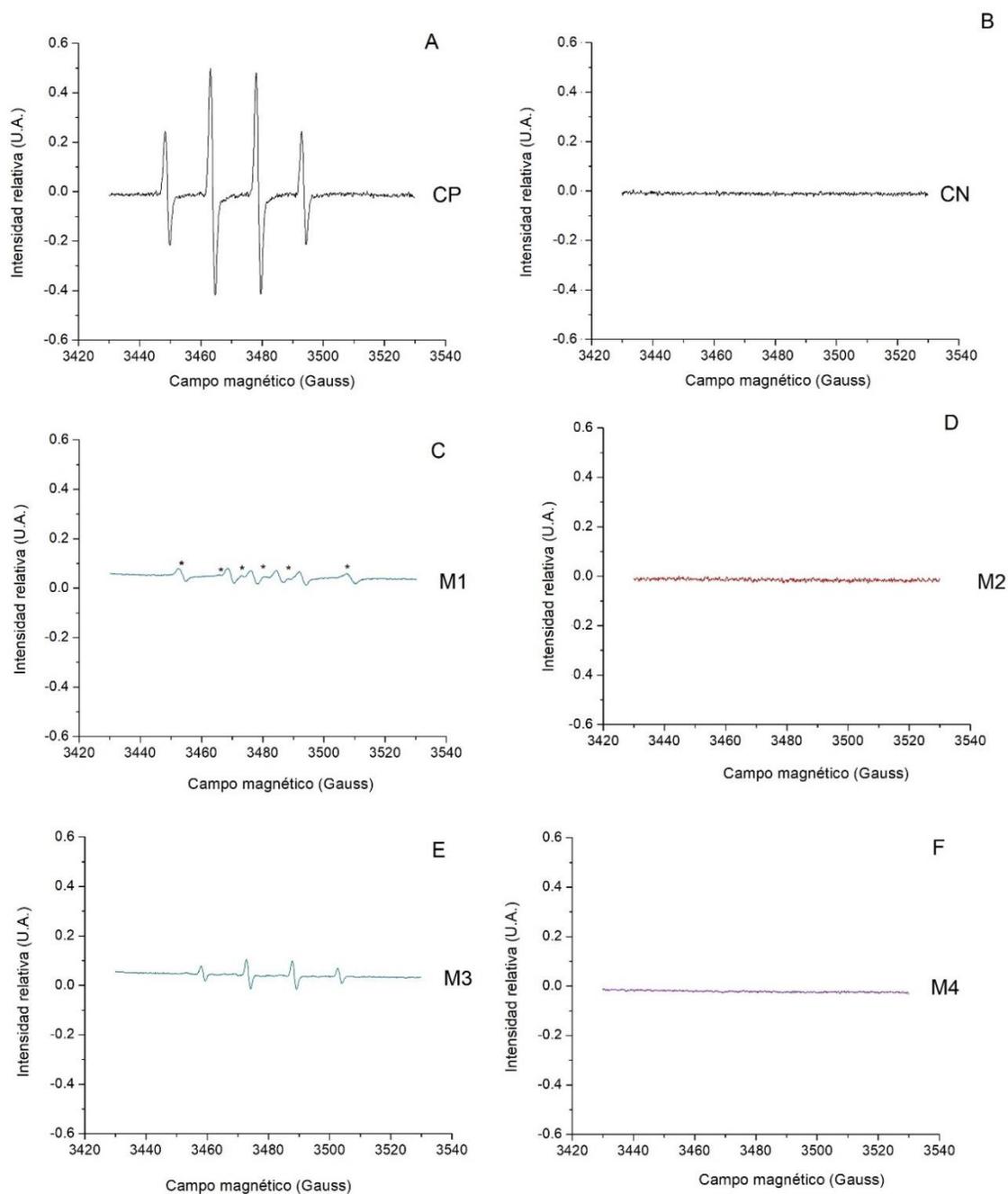


Fig. 6. Capacidad de mieles para generar radicales hidroxilo. Espectros EPR de (A) control positivo (CP), (B) control negativo (CN), (C) M1, (D) M2, E (M3) y F (M4).

2.3. Capacidad de secuestro de radicales hidroxilo exógenos

Las muestras de miel se evaluaron en su capacidad para secuestrar o neutralizar radicales OH•, es decir su capacidad antioxidante. Para ello, se prepararon soluciones de miel 50% p/v, las cuales fueron dosadas con H₂O₂ 30% (v/v). Se indujo la reacción de Fenton, se agregó DMPO y se midió la disminución en la señal de los espectros EPR con respecto a un control positivo.

En la Fig. 7 se muestran los espectros EPR de los controles positivo (Fig. 7 A), negativo (Fig. 7 B) y de las muestras de miel estudiadas (Figs. 7 C-F). En el espectro EPR del control positivo, H₂O₂ 30% (p/v), se observó el cuarteto de líneas característico del radical OH• ($a_N = 15G$, $a_H = 15G$). La ausencia de señal en el control negativo se debe a la descomposición de H₂O₂ por la acción de la enzima catalasa.

Todas las mieles estudiadas exhibieron capacidad para secuestrar radicales OH•. M1 presentó la menor intensidad de señal EPR, es decir, resultó la miel con mayor capacidad de neutralización de EROs. La señal M4 disminuyó, aproximadamente, a la mitad con respecto al control positivo, mostrando menor capacidad antioxidante que M1. M2 y M3 presentaron una capacidad de secuestro similar entre ellas, sin embargo, bastante menor a la observada para M1. Estos resultados pueden ser correlacionados con el origen geográfico y, por lo tanto, con su contenido en compuestos flavonoides. M1 ha sido caracterizada como miel de *Prosopis* spp., según un estudio llevado a cabo por Iurlina (2011). Esta miel, de color ámbar oscuro mostró un contenido total de flavonoides mayoritarios de 7,73 mg de quercetina cada 100g de miel (mg QE/100g), este valor resulta considerablemente mayor al contenido de flavonoides reportado por numerosos autores para mieles mono- y multiflorales, encontrándose éstos entre 2,12 y 6,35 mg QE/100 g de miel (Ferreira y col., 2009; Yao y col., 2004). M2, M3 y M4 corresponden a mieles provenientes de la provincia de Buenos Aires, las cuales suelen presentar un contenido de

compuestos flavonoides bastante menor, 2,43 mg QE/100 g miel, siendo las características geoclimáticas de la región de procedencia esenciales en las características del perfil de compuestos flavonoides de las mismas (Iurlina, 2011).

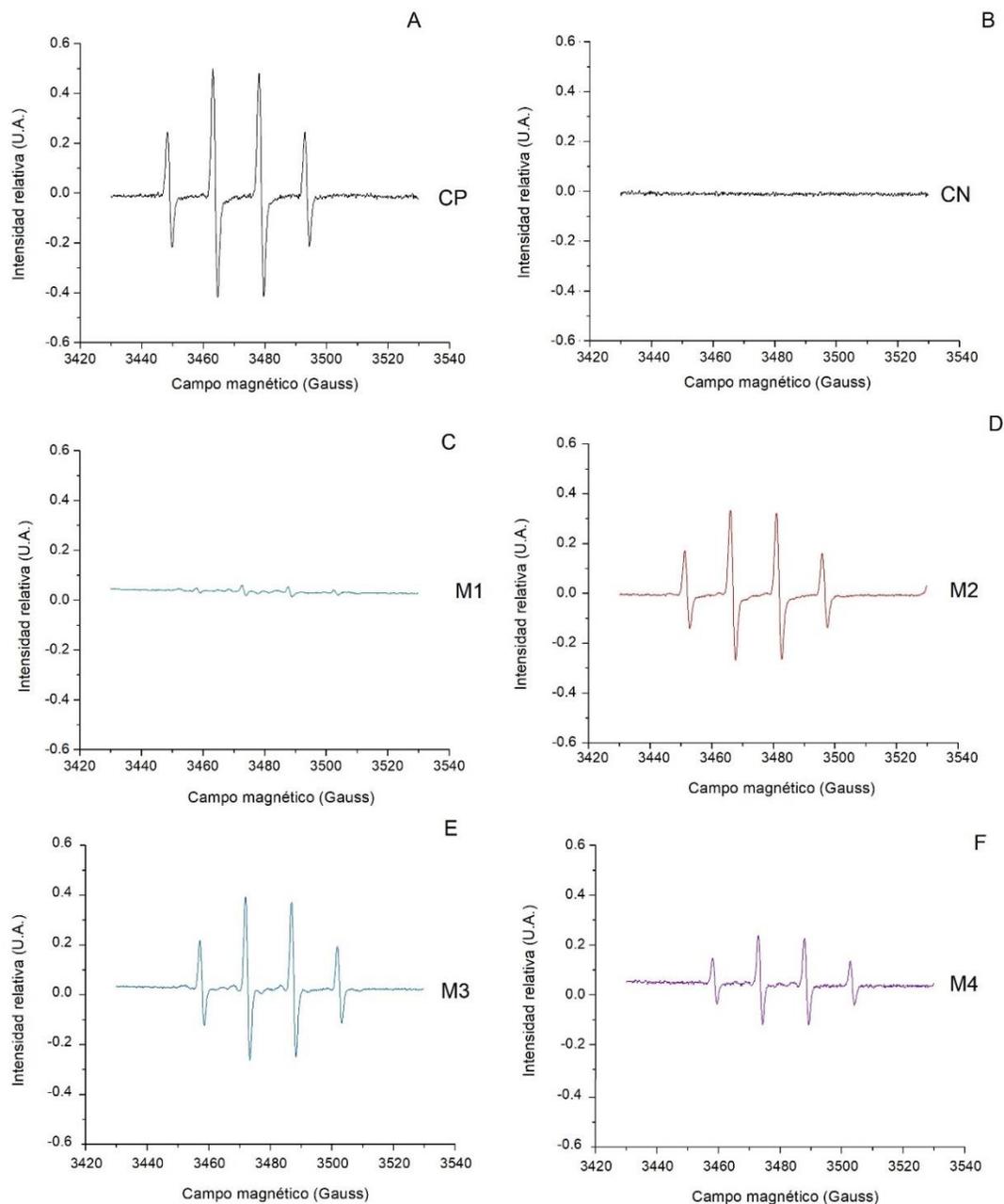


Fig. 7. Capacidad de secuestro de radicales hidroxilo por parte de mieles. Espectros EPR de (A) control positivo (CP), (B) control negativo (CN), (C) M1, (D) M2, E (M3) y F (M4).

La capacidad de generar y secuestrar especies radicales libres depende de diversos factores, como la concentración de enzimas y compuestos antioxidantes presentes en la matriz, los cuales, a su vez, se encuentran definidos por la vegetación y las características geoclimáticas de la región.

Debido al comportamiento pro- y antioxidante exhibido por la miel M1, fue elegida para evaluar su capacidad como potencial modificador de sistemas proteicos. En los capítulos siguientes será denominada miel de *Prosopis* spp., en base al contenido mayoritario de polen de esta especie vegetal (Iurlina, 2011).

3. Conclusiones

Las mieles argentinas estudiadas presentaron comportamientos disímiles frente a la capacidad para producir y secuestrar radicales $\text{OH}\cdot$. Todas las muestras fueron hábiles en el secuestro de radicales; en tanto que, sólo las mieles M1 y M3 exhibieron un comportamiento pro-oxidante.

CAPÍTULO IV
EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN MICROBIANA
Y PERFIL FERMENTATIVO DE BAL

1. Introducción

1.1. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo de bacterias Gram positivas agrupadas en base a ciertas características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. Se trata de cocos o bacilos, anaerobios, aerotolerantes, no formadores de esporas, carentes de catalasa y citocromos, que producen ácido láctico como uno de los principales productos de la fermentación de carbohidratos. De acuerdo con la clasificación taxonómica actual, pertenecen al phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, y orden *Lactobacillales*. Las diferentes familias incluyen *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae*. Las BAL son conocidas principalmente por su papel en la fermentación de alimentos y bebidas. Una vasta variedad de propiedades metabólicas se obtienen de este grupo de lactobacilos, la mayor parte aislados de cereales o derivados, entre ellas: fermentación de carbohidratos, proteólisis y síntesis de ácidos orgánicos (láctico y acético) que contribuyen al desarrollo del flavour agrio, característico de estos productos (Di Cagno y col., 2003). El crecimiento y supervivencia de estos microorganismos en sus nichos depende de su capacidad para responder a las condiciones del ambiente, como temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes y densidad poblacional (Serrazanetti y col., 2009).

1.2. Metabolismo fermentativo de BAL

Las BAL están adaptadas a vivir en ambientes microaerófilos ricos en nutrientes, que incluyen la presencia de azúcares, péptidos, aminoácidos preformados y vitaminas del complejo B (Jay, 2000; Vrancken y col., 2008). La mayor parte de las BAL obtienen energía sólo del metabolismo de los carbohidratos y compuestos fermentables relacionados, de manera que su desarrollo está restringido a sustratos ricos en azúcares (Peñaflor y García Guerrero, 2007). Las BAL han sido divididas en dos grupos en base a los productos finales de su metabolismo: homo- y heterofermentativas.

Las especies que siguen la vía homofermentativa (Fig. 8), también llamada ruta Embden-Meyerhoff-Parnas o glucólisis, son capaces de convertir un mol de hexosa en dos moles de ácido láctico (Corsetti y Setani, 2007; Parras-Huerta, 2010). Por su parte, y por medio de la vía 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa (6-PG/PK) (Fig. 9), las bacterias heterolácticas son capaces de metabolizar un mol de glucosa en un mol de ácido láctico, un mol de dióxido de carbono (CO_2) y un mol de ácido acético o etanol, dependiendo de la disponibilidad de sustratos adicionales que pueden actuar como aceptores de electrones (Corsetti y Settanni, 2007; Vrancken y col.,

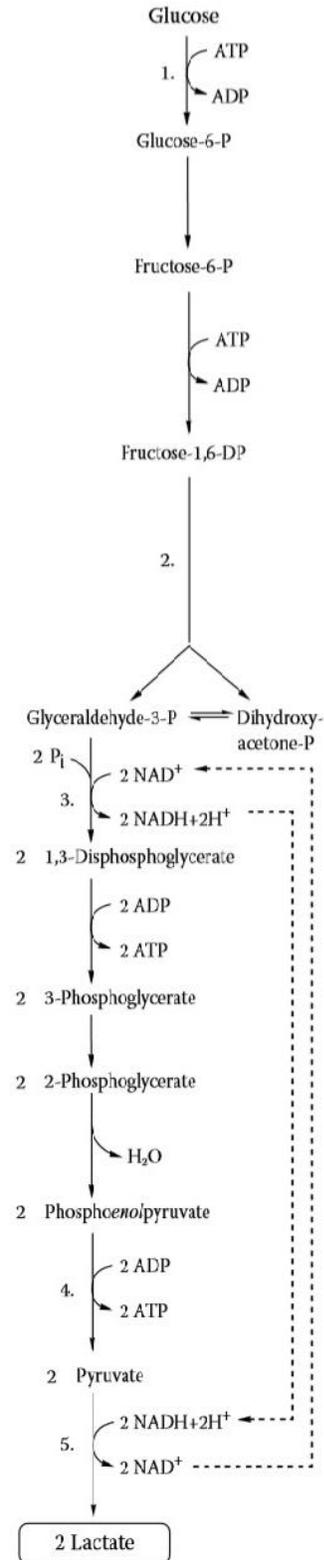


Fig. 8. Ruta metabólica homofermentativa (Lahtinen y col., 2012).

2008). En esta vía se forma sólo un mol de ATP si el intermediario acetilfosfato es reducido a etanol. Sin embargo, si el acetilfosfato es convertido en ácido acético, en presencia de aceptores de electrones alternativos, se genera un mol extra de ATP (Lahtinen y col., 2012). Todos los miembros de los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, y *Vagococcus* son homofermentativos, como también lo son algunas especies del género *Lactobacillus*. Los géneros heterofermentativos están comprendidos por *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera*, y especies de *Lactobacillus*. Las cepas heterofermentativas han adquirido un mayor interés a nivel industrial, debido a que producen compuestos característicos del aroma y sabor, como el gliceraldehido y diacetilo (Jay, 2000; Parra-Huerta, 2010). De acuerdo con el perfil fermentativo exhibido, el género *Lactobacillus* ha sido subdividido en tres grupos: el Grupo 1, incluye especies homofermentativas obligadas como *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* y *L. delbrueckii*; se trata de bacterias termofílicas que no son capaces de fermentar pentosas. El Grupo 2 consiste en especies heterofermentativas facultativas, como *L. casei*, *L. plantarum* y *L. sake*, las cuales son capaces de fermentar pentosas; y el Grupo 3, comprendido por especies heterofermentativas obligadas, incluyendo *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. reuteri* y *L. sanfrancisco* (Jay, 2000).

Las hexosas diferentes a la glucosa, como manosa, galactosa y fructosa, pueden ingresar a las vías mencionadas luego de ser isomerizadas y fosforiladas en glucosa-6-fosfato o fructosa-6-fosfato (Corsetti y Setani, 2006; Lahtinen y col., 2012). Por su parte, las pentosas son fosforiladas por especies heterofermentativas y convertidas en ribulosa-5-fosfato o xilulosa-5-fosfato. Estos intermediarios rendirán cantidades equimolares de ácido láctico y acético, sin la producción de CO₂. Sólo un número reducido de especies homofermentativas, como *P. pentosaceus*, poseen la capacidad de fermentar pentosas, incrementando su potencial metabólico (Axelsson, 2004). Los monosacáridos no son los únicos carbohidratos utilizados por las BAL como fuente energética. En las harinas de trigo y centeno, éstos se encuentran en baja concentración; constituyen entre 1,55 y 1,85% (p/p), dependiendo del balance que existe entre la hidrólisis de

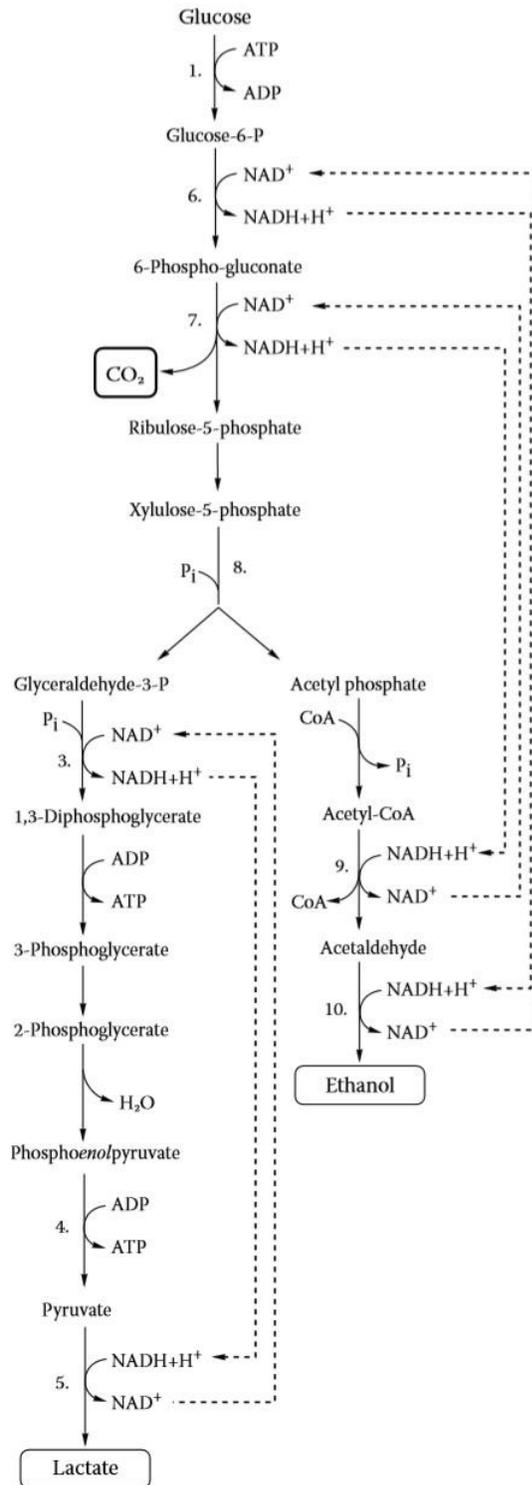


Fig. 9. Ruta heterofermentativa (Lahtinen y col., 2012).

almidón y las enzimas endógenas de las harinas y/o enzimas microbianas (Martinez-Anaya,

1996). De hecho, la maltosa es el principal azúcar fermentable presente en masas; este disacárido ingresa a las células microbianas a través del transportador maltosa/H⁺ (Neubauer y col., 1994), o bien mediante el sistema de transporte activo fosfotransferasa (Le Breton y col., 2005). A su vez, al ingresar a la célula, la maltosa puede ser escindida en dos moléculas de glucosa gracias a la actividad de una maltosa fosforilasa. La presencia de estas enzimas representa una ventaja energética adicional para las BAL, dado que posibilita la obtención de dos monosacáridos fermentables (Vrancken y col., 2008). Una característica importante de las BAL heterofermentativas es su capacidad para utilizar moléculas orgánicas como aceptores alternativos de electrones. La fermentación de la fructosa es un ejemplo en donde el mismo compuesto puede funcionar como dador y aceptor de electrones. Al actuar como aceptor, la fructosa es reducida a manitol en una reacción catalizada por la enzima manitol deshidrogenasa y, en consecuencia, se regenera NAD⁺ (Lahtinen y col., 2012; Vrancken y col., 2008); al mismo tiempo que el acetilfosfato es convertido en acetato. Al seguir esta vía se evita la necesidad de reducir el acetilfosfato en etanol para regenerar NAD⁺ y se produce la ganancia de un mol de ATP adicional, incrementando significativamente el rendimiento energético durante este proceso (Gobbetti y col., 1995).

1.3. BAL como fermentadoras de masas ácidas

Las masas ácidas, o *sourdoughs*, consisten en una mezcla de harinas y agua fermentada por BAL y levaduras; siendo las BAL los microorganismos predominantes tanto numérica como metabólicamente (Gänzle y col., 2008). La fermentación puede ser iniciada de manera espontánea, como consecuencia de la microflora autóctona de los granos de cereal, que incluye BAL y levaduras, o bien por el agregado de cultivos iniciadores o *strarters* de BAL (Aponete et al., 2014; Di Cagno et al., 2003).

La fermentación espontánea comienza una vez que la harina es mezclada con el agua sin el agregado de un cultivo iniciador o de una porción de masa madre, es decir una fracción de otra masa que haya sido previamente fermentada por BAL. Las especies microbianas presentes en estas masas dependen de los microorganismos que constituyen la microflora natural de las materias primas. La microflora predominante en masas fermentadas espontáneamente consiste, principalmente, en especies homo- y heterofermentativas de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* presentes en los granos de trigo y centeno (Salovaara, 1998). Dentro de las BAL homofermentativas es frecuente encontrar las especies *Lactobacillus casei*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis* y *P. pentosaceus*; mientras que, las especies heterofermentativas dominantes son *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum* y *L. plantarum* (Gänzle y col., 2008; Stolz, 1995).

Por otra parte, en el proceso de elaboración de masas ácidas comerciales se utilizan cultivos iniciadores en una concentración de alrededor de 10^8 UFC/g (Stolz, 1995), cuya incorporación mejora las propiedades reológicas y organolépticas de las masas (Barber y col., 1991). La capacidad de las BAL para producir ácidos orgánicos aporta numerosos beneficios a las masas ácidas, entre los cuales pueden destacarse el desarrollo del *flavour* agrio característico y el mejoramiento del tiempo de vida útil de los productos panificados (Di Cagno y col., 2003; Vermeulen y col., 2006). Además de cumplir un rol primordial sobre las características organolépticas de las masas, la actividad de las BAL tiene un efecto sobre la fracción proteica de las harinas durante la fermentación de masas ácidas, y dado que la red de gluten determina las propiedades reológicas y funcionales del sistema, este efecto incide sobre la retención de gas, el volumen de pan, la textura y el grado de endurecimiento (Gerez y col., 2012; Vermeulen y col., 2006).

En este sentido, se propone estudiar el efecto de la miel sobre la cinética de crecimiento y perfil fermentativo de BAL.

2. Resultados

2.1. Actividad glucosa oxidasa en masas suplementadas con miel

La actividad glucosa oxidasa (GOX) en miel de *Prosopis* spp. (M1) fue estudiada como parte del análisis fisicoquímico efectuado en el **Capítulo III (2.1.)**. Sin embargo, resulta fundamental evaluar su actividad en masas suplementadas con esta miel, de manera de poder confirmar su actividad en el sistema como potencial modificador de las proteínas de gluten. En todas las muestras estudiadas se obtuvieron reacciones positivas para la actividad GOX. Los controles positivo y negativo consistieron en muestras de masas de trigo-centeno con y sin agregado de miel, respectivamente.

2.2. Cinética de crecimiento de BAL en masas

La evolución de la población de BAL fue evaluada a 0 (t_0), 6 (t_6), 12 (t_{12}) y 19 (t_{19}) h desde el comienzo de la fermentación. En la Fig. 10 se muestran los recuentos de células para masas sin inocular (control) y masas individualmente inoculadas con la respectiva cepa de BAL. En masas control, los recuentos de células se encontraron entre $2,32 \pm 0,13$ (t_0) y $3,74 \pm 0,11$ Log UFC/g (t_{19}). Las BAL, junto con las levaduras, constituyen la microflora natural de los granos de cereal (Aponte y col., 2014), y es frecuente encontrar a estos microorganismos en masas preparadas a partir de diferentes harinas. Sin embargo, la concentración de BAL naturalmente presente en las harinas de trigo y centeno utilizadas no fue suficiente para producir una acidificación significativa en masas control (Fig. 12). Por el contrario, la adición de cultivos starter incrementó apreciablemente el contenido de ácidos orgánicos en estos sistemas como resultado de su metabolismo fermentativo (Fig. 12).

Coincidiendo con el inóculo estandarizado de BAL agregado a las masas, todos los recuentos iniciales estuvieron alrededor de 8,5 Log UFC/g. *L. Plantarum* exhibió la mayor velocidad de crecimiento, incrementando significativamente su población a $9,43 \pm 0,06$ Log UFC/g luego de 6 h de incubación. Gänzle y col. (2008) han destacado esta especie por su elevada capacidad de adaptación al ambiente de una masa ácida, motivo por el cual ha sido elegida como una de las BAL más ampliamente utilizada en procesos fermentativos industriales. El resto de las cepas requirieron 12 h de fermentación para alcanzar recuentos apreciables. Al finalizar el período de incubación (t_{19}), los recuentos de BAL fueron, en promedio, 11 Log UFC/g, sin presentar diferencias significativas entre cepas.

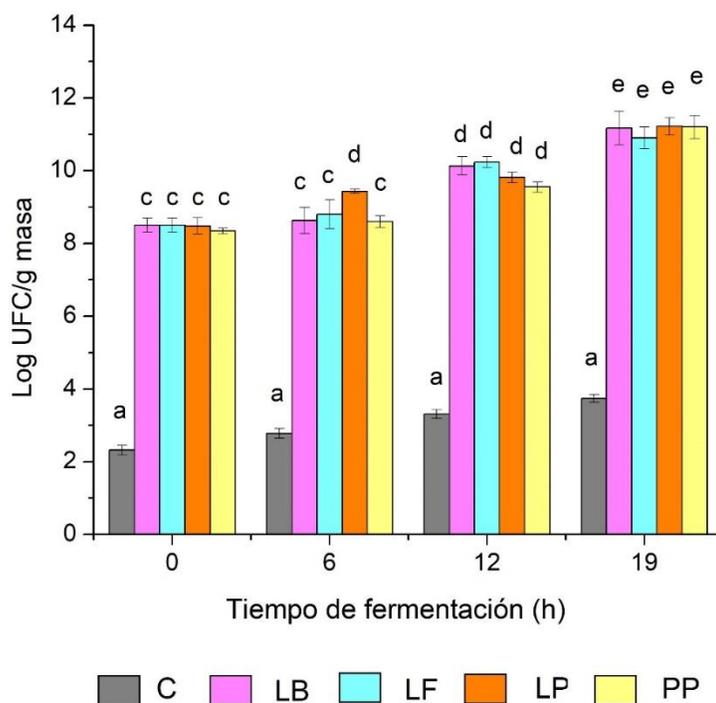


Fig. 10. Evolución de la población de BAL (Log UFC/g de masa) durante 19 h de fermentación: masas control (C) y masas fermentadas con *L. bulgaricus* (LB), *L. fermentum* (LF), *L. plantarum* (LP) y *P. pentosaceus* (PP). Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0,05$.

Por otra parte, el agregado de miel de *Prosopis* spp. favoreció el crecimiento de las BAL autóctonas de harinas de trigo y centeno (Fig. 11), aumentando significativamente el número de células a $4,69 \pm 0,38$ Log UFC/g de masa (t_{19}).

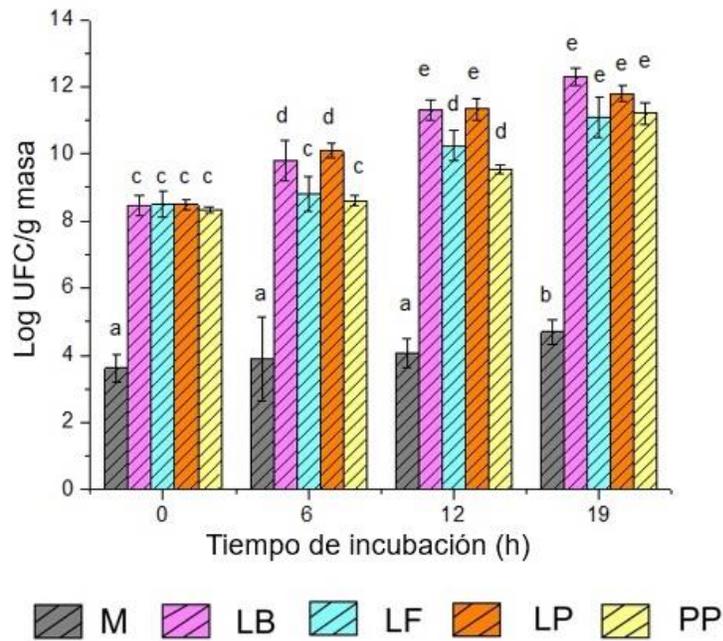


Fig. 11. Evolución de la población de BAL (Log UFC/g de masa) durante 19 h de fermentación: masas con miel sin inocular (M) y masas con miel fermentadas con *L. bulgaricus* (LB), *L. fermentum* (LF), *L. plantarum* (LP) y *P. pentosaceus* (PP). Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0,05$.

Adicionalmente, la presencia de miel modificó la cinética de crecimiento presentada por *L. bulgaricus* y *L. plantarum*; ambas cepas exhibieron la mayor velocidad de crecimiento, aumentando notablemente el número de células entre 6 y 12 h de incubación.

En tanto que, *L. fermentum* y *P. pentosaceus* necesitaron entre 12 y 19 h de incubación para alcanzar recuentos semejantes. En sistemas viscosos, como lo es una masa, las células bacterianas y/o levaduras se encuentran atrapadas dentro de la matriz, y la difusión de los metabolitos y nutrientes, desde y hacia las células, se encuentra enlentecida, afectando su cinética de crecimiento y desempeño fermentativo (Vernocchi y col., 2008); de manera que, es necesario un tiempo de fermentación superior a 8-16 h para observar recuentos de células de aproximadamente 10^{10} UFC/g (Vermeulen y col, 2006).

2.3. Perfil fermentativo de BAL en masas ácidas

El perfil de acidificación fue distintivo para cada cepa estudiada. En las Figs. 12 y 13 están presentados los valores de pH y TTA de masas sin y con miel e inoculadas con las cepas de BAL.

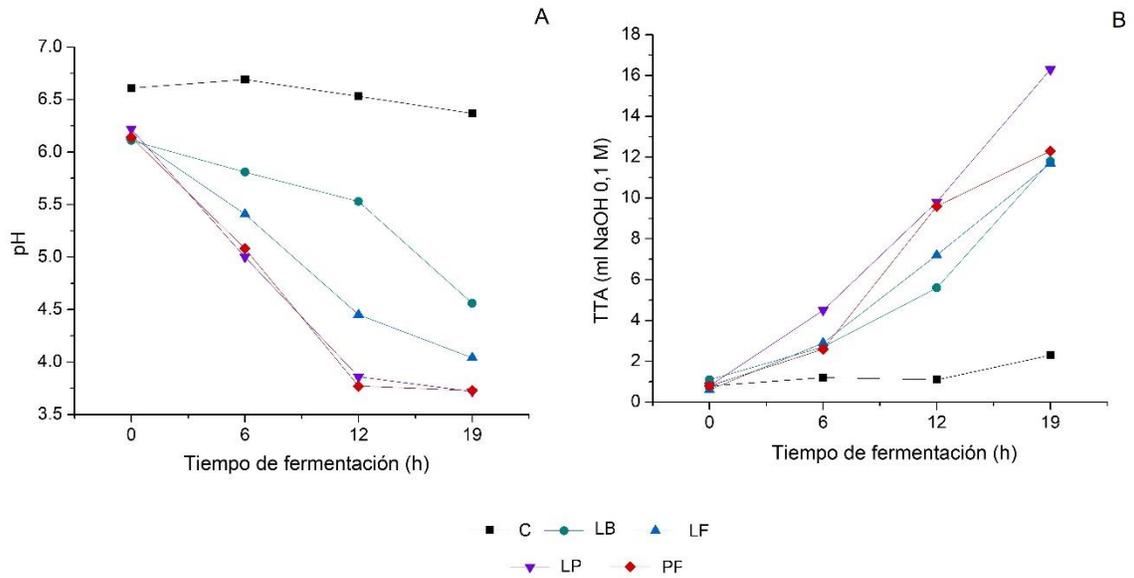


Fig. 12. Perfil de acidificación. Valores de pH (A) y TTA (B) de masa control (C) y masas fermentadas durante 19 h con *L. bulgaricus* (LB), *L. fermentum* (LF), *L. plantarum* (LP) y *P. pentosaceus* (PP).

Los valores de pH de masas sin agregado de BAL, sin y con miel agregada, se mantuvieron aproximadamente constantes durante 19 h de incubación, siendo ligeramente más ácidas las masas con miel (pH_{19} : $6,04 \pm 0,36$). Esta diferencia respecto de la masa sin miel, no fue significativa y se atribuyó a la acidez natural de la miel, cuya presencia descendió levemente el pH de las masas.

Con respecto a masas inoculadas, *L. bulgaricus* fue el microorganismo menos acidificante de las cepas estudiadas (pH_{19} : $4,56 \pm 0,24$); sin embargo, la presencia de miel

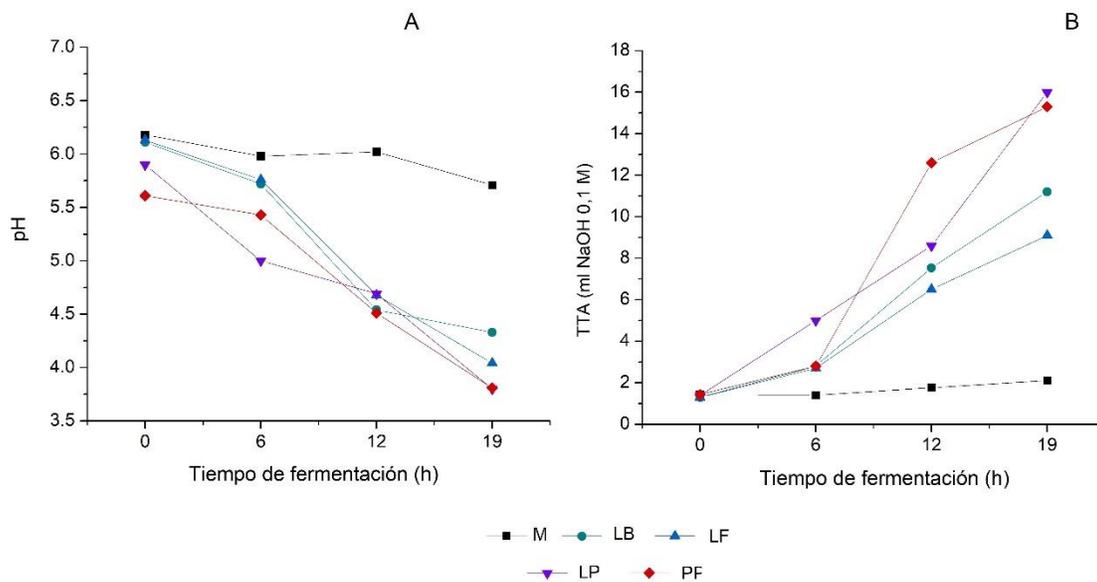


Fig. 13. Perfil de acidificación. Valores de pH (A) y TTA (B) de masa con miel sin inocular (M) y masas con miel fermentadas durante 19 h con *L. bulgaricus* (LB), *L. fermentum* (LF), *L. plantarum* (LP) y *P. pentosaceus* (PP).

favoreció su cinética de acidificación, con un incremento significativo en la producción de ácidos orgánicos entre 6 y 12 h de incubación. *L. plantarum* y *P. pentosaceus* fueron los microorganismos más acidificantes, exhibiendo las pendientes de acidificación más pronunciadas en masas sin y con miel agregada, alcanzando valores de pH de alrededor de 3,8 (t_{19}). La presencia de miel no modificó la cinética de acidificación de *L. plantarum*; mientras que la producción de ácidos exhibida por *P. pentosaceus* mejoró notablemente, registrando valores de TTA de $15,3 \pm 1,3$ ml NaOH 0,1 M. En estudios previos ha sido comprobada la capacidad de *P. pentosaceus* para crecer y fermentar en soluciones de miel hasta 50% (p/v) (Nutter y col., 2016). Por otro lado, la capacidad fermentativa *L. fermentum* tampoco fue significativamente afectada por la presencia de miel, registrando valores de pH de 4,04 al finalizar el período fermentativo.

En masas ácidas, el perfil de acidificación de cada cepa de BAL depende de la disponibilidad de carbohidratos solubles presentes en las harinas y de la capacidad que poseen las BAL para metabolizarlos (Salovaara, 1998). Los principales azúcares

fermentables en harinas de trigo y centeno son maltosa, sacarosa, glucosa y fructosa, cuyo contenido en harinas de trigo se encuentra alrededor de 1,6% (p/p), mientras que en harinas de centeno se presentan en fracciones traza. Sin embargo, esta última posee una concentración relativamente elevada de pentosanos, componentes de las paredes celulares del endospermo y salvado, presentes en diferentes concentraciones en los cereales; las harinas de trigo contienen 1,4% (p/p), mientras que en el centeno rondan el 10% (p/p) (Eliasson, 1998). Los pentosanos pueden ser parcialmente hidrolizados por enzimas endógenas de cereales, incrementando la biodisponibilidad de sus azúcares constituyentes (Collar, 1996; Rocken, 1996), que incluyen a las pentosas D-xilosa y L-arabinosa (Garnero y col., 2017), las cuales pueden ser utilizadas como fuente de carbono por las BAL. Al igual que la mayoría de las especies de lactobacilos homofermentativos, *L. bulgaricus* es incapaz de fermentar pentosas (Axelsson, 2004); de manera que, la fermentación de azúcares en masas inoculadas con esta cepa está restringida a las hexosas biodisponibles, condicionando el grado de acidez del sistema. En tanto que, *P. pentosaceus* y los lactobacilos heterofermentativos *L. plantarum* y *L. fermentum*, son capaces de utilizar las pentosas de las harinas como fuente de energía.

La actividad fermentativa de las BAL produce modificaciones notorias sobre las propiedades organolépticas y reológicas de una masa. El incremento de la acidez modifica la viscoelasticidad de varias formas: (1) favorece la gelificación de pentosanos, proceso que obstaculiza la agregación proteica; y (2) promueve la activación de proteasas endógenas de la harina de trigo (proteinasas aspárticas y carboxipeptidasas) cuya actividad máxima se produce a pH 3,0-3,5 (Bleukx y Delcour, 2000; Vermeulen y col, 2006). Estas enzimas son responsables de la hidrólisis de las proteínas de gluten, modificando el sabor, volumen y textura de las masas (Gänzle y col., 2008).

Adicionalmente, la incorporación de miel a las masas favoreció el crecimiento y el metabolismo fermentativo de la mayoría de las BAL estudiadas debido al aporte extra de azúcares simples. La miel está constituida, de acuerdo a su origen, por un 55-85% (p/v) de glucosa y fructosa, que representan fuentes de carbono fácilmente fermentables para las BAL. Por otro lado, la fructosa puede ser utilizada como aceptor alternativo de electrones por cepas heterofermentativas, incrementando el rendimiento energético por generación de un mol adicional de ATP (Lahtinen y col., 2012; Vrancken y col., 2008). Numerosos estudios han evidenciado el efecto de la miel sobre el crecimiento de BAL. Shamala y col (2000) reportaron el crecimiento de *L. plantarum* en concentraciones hasta 9% (p/v). Estudios realizados por nuestro grupo evidenciaron tolerancias bien diferenciadas entre cepas de BAL; en tanto *P. pentosaceus* creció en concentraciones hasta 50 % (p/v), *L. fermentum* sólo toleró un 12,5 % (p/v) (Nutter y col., 2016).

3. Conclusiones

Las bacterias ácido lácticas presentaron perfiles fermentativos característicos que condicionaron la acidificación del sistema *masa ácida*. La suplementación con miel favoreció la cinética de crecimiento de *L. bulgaricus* y *L. plantarum*, y mejoró el perfil fermentativo de *L. bulgaricus* y *P. pentosaceus*.

L. plantarum fue la cepa más acidificante, aunque la suplementación con miel no modificó significativamente los valores de pH y TTA. En tanto, el agregado de miel sí mejoró el perfil fermentativo de *P. pentosaceus*, incrementando la concentración de ácidos, respecto de las masas sin miel.

CAPÍTULO V

MICROESTRUCTURA DE MASAS ÁCIDAS

1. Introducción

1.1. Microestructura de masas

La funcionalidad de una masa está dada por la formación de una red viscoelástica de gluten, cuyo estudio es fundamental para comprender relaciones estructura-función de los ingredientes que conforman estos sistemas (Lucas y col., 2016). Dicha funcionalidad es caracterizada, a escala macroscópica, mediante mediciones reológicas (Bernkalu y col., 2018). El comportamiento reológico de una masa depende de su composición y microestructura, es decir, del arreglo espacial de sus constituyentes (McCann y col., 2013). La elucidación de las interacciones producidas entre sus componentes, a escala microestructural, es lograda mediante técnicas microscópicas como son la microscopia electrónica de barrido (SEM) y la microscopia de barrido láser confocal.

1.2. Proteínas de gluten

El gluten puede definirse como una matriz de proteínas que permanece insoluble y sin alterar cuando la harina de trigo es lavada con agua; como consecuencia del lavado se eliminan gránulos de almidón y otros componentes solubles (McCann, 2013). Una vez que las proteínas son hidratadas, se establecen interacciones entre sus fracciones principales, gliadinas y gluteninas, que otorgan a la masa sus propiedades características de absorción de agua, cohesividad, viscosidad y elasticidad (McCann, 2013; Wieser, 2007). De acuerdo a su solubilidad en etanol-agua (60% v/v), las proteínas de gluten pueden clasificarse en gliadinas solubles y gluteninas insolubles (Grosch y Wieser, 1999). Ambas fracciones son importantes a la hora de impartir propiedades reológicas, pero sus funciones son diferentes. Las gliadinas hidratadas poseen baja elasticidad y son menos cohesivas que las gluteninas,

confiriendo, principalmente, viscosidad y extensibilidad a las masas. En contraste, las gluteninas hidratadas imparten tanto cohesividad como elasticidad (Wieser, 2007). Estas propiedades funcionales, que hacen del gluten un producto único, se deben a la estructura y grado de polimerización de las proteínas. Durante los procesos de amasado, procesamiento y cocción, las gliadinas y gluteninas interactúan de varias maneras por medio de interacciones por puente de hidrógeno, que son estabilizados por uniones covalentes, como enlaces disulfuro y ditirosina, formando polímeros de diversos tamaños y formas (McCann y col., 2013; Rasheed, 2015). Durante el amasado, las subunidades de glutenina tienden a ordenarse linealmente promoviendo entrecruzamientos por puentes disulfuro, lo cual incrementa la fuerza de la masa (McCann y col., 2013). Adicionalmente, las cadenas polipeptídicas pueden conectarse entre sí a través de enlaces covalentes ditirosina formados entre dos residuos tirosina intermoleculares (Tilley y col., 2001). De esta manera, la presencia de gliadinas y gluteninas es responsable de las propiedades viscoelásticas características de las masas (Wieser, 2003; Wieser, 2007).

El modelo más aceptado para explicar las propiedades viscoelásticas del gluten fue propuesto por Belton (1999) y es denominado *loops and trains* (Fig. 14). Según este modelo, el polímero de gluten presenta zonas más curvas o “loops” y zonas más rectas o “trains”, y postula para los dominios repetitivos de las gluteninas que:

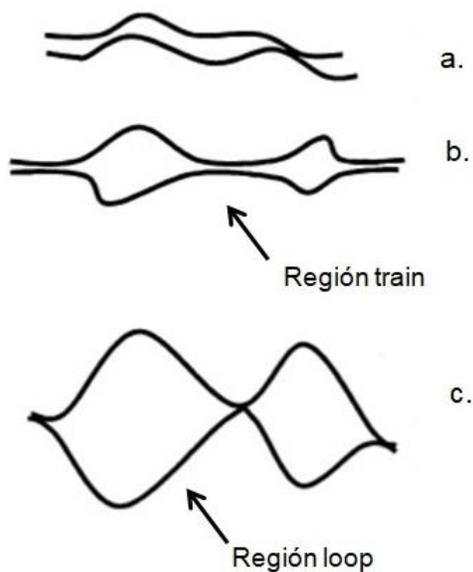


Fig. 14. Modelo loops and trains. a. estado de baja hidratación y elevada interacción. b. estado de hidratación intermedia, baja relación loop/train. c. estado de hidratación elevado, alta relación loop/train (Belton, 1999).

(a) Cuando el grado de hidratación es bajo, las proteínas se encuentran en un estado desordenado de escasa estructura. Existen numerosas interacciones proteína-proteína a través de puentes de hidrógeno entre residuos de glutamina, el aminoácido más abundante en esta fracción proteica.

(b) A medida que aumenta el grado de hidratación (nivel intermedio), las proteínas adquieren movilidad e interactúan entre sí para formar β -sheets (regiones "train").

(c) En un estado de hidratación aún mayor, la movilidad de las proteínas se incrementa y conduce a la formación de puentes de

hidrógeno entre moléculas de agua y residuos de aminoácidos, lo cual se traduce en regiones donde las interacciones intercadena se rompen ("loops"). Estas regiones son móviles y están asociadas a estructuras β -turns. De esta manera, el gluten es considerado una entidad dinámica (Belton, 1999; Wellner, 2005). Adicionalmente, las uniones disulfuro juegan un rol fundamental en este modelo. A través de las mismas se mantienen unidas las moléculas en algunos puntos por medio de enlaces covalentes, lo cual imparte estabilidad estructural y mantiene la integridad de la red de gluten (Shewry y col., 2001).

1.2.1. Gliadinas

Las gliadinas comprenden un grupo de proteínas monoméricas clasificadas, en base a su secuencia de aminoácidos y a sus pesos moleculares, en cuatro tipos diferentes: ω 5-, ω 1,2-, α/β - y γ -gliadinas (Fig. 15) (Wieser, 1996). Las diferencias entre cada tipo de gliadina son pequeñas debido a sustitución, delección e inserción de residuos de aminoácidos individuales. Las ω -gliadinas se caracterizan por presentar los contenidos más elevados de glutamina, prolina y fenilalanina, que en conjunto comprenden el 80% del total de aminoácidos presentes, formando secuencias repetitivas ricas en estos aminoácidos. Asimismo, la mayoría de las ω -gliadinas carecen de cisteína, siendo incapaces de formar puentes disulfuro, por lo que están limitadas para formar interacciones covalentes en la masa (Tatham, 1995). Las α/β - y γ -gliadinas presentan proporciones menores de glutamina y prolina que las ω -gliadinas, y difieren significativamente en el contenido de algunos aminoácidos, como tirosina. El extremo N-terminal de estas gliadinas consiste principalmente en secuencias repetitivas ricas en glutamina, prolina y fenilalanina; mientras que el dominio C-terminal presenta secuencias no repetitivas con menor contenido de glutamina y prolina que el N-terminal. Asimismo, presentan seis (α/β -gliadinas) y ocho (γ -gliadinas) residuos cisteína, a partir de los cuales son capaces de formar tres y cuatro enlaces disulfuro intracadena, respectivamente (Grosch y Wieser, 1999). Estos enlaces disulfuro son importantes para mantener el plegamiento de la estructura, que determina la naturaleza de las interacciones no covalentes con la red de gluteninas (Wrigley y col., 1998). Las α/β - y γ - gliadinas contienen 30-35% de estructura α -hélice. En tanto que, las α -gliadinas contienen además un 10% de β -sheets, y las ω -gliadinas se presentan en la forma β -turn (Tatham y col., 1995).

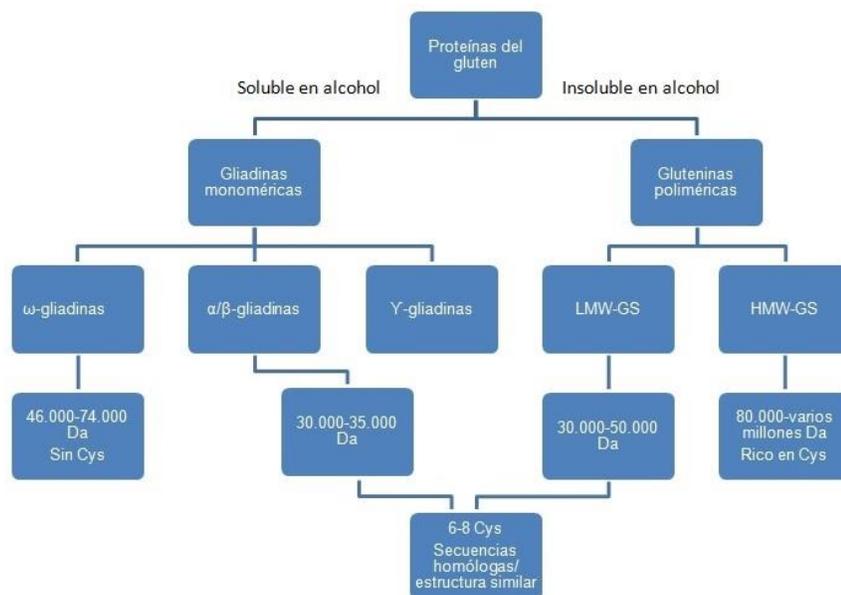


Fig. 15. Clasificación de las proteínas de gluten de acuerdo a Weiser y col., 2007. LMW-GS: subunidad de glutenina de bajo peso molecular; HMW-GS: subunidad de glutenina de elevado peso molecular; Da: Dalton; Cys: cisteína.

1.2.2. *Gluteninas*

Las gluteninas consisten en proteínas agregadas unidas a través de puentes disulfuro, las cuales presentan un amplio rango de pesos moleculares, entre 80.000 y varios millones de Daltons (Fig. 15) (Wieser y col., 2007). La distribución de pesos moleculares de las gluteninas es uno de los factores determinantes de las propiedades de una masa. Los polímeros de mayor tamaño son denominados en conjunto macropolímero de glutenina y su elevado contenido en la harina de trigo (20-40 mg/g) confiere fuerza, elasticidad y volumen. Las gluteninas, en base a sus pesos moleculares, pueden clasificarse en subunidades de bajo peso molecular (LMW-GS) y subunidades de elevado peso molecular HMW-GS. Las LMW-GS son similares a las α/β -gliadinas en términos de su secuencia de aminoácidos y a su estructura de dominios N- y C- terminal. Comprenden el 20% de las proteínas de gluten y contienen ocho residuos cisteína, seis de ellos ubicados en el dominio N-terminal, pudiendo formar puentes disulfuro intracadena. Mientras que los residuos

adicionales, debido a impedimentos estéricos, son incapaces de formar enlaces intracadena, generando puentes disulfuro intercadena al enlazarse a otras gluteninas. La importancia de los enlaces disulfuro en la estabilización del macropolímero de gluten (MPG) fue demostrada mediante la adición de agentes reductores, que produjo el debilitamiento de las masas y el aumento de la solubilidad de las gluteninas (Shewry y col., 2001).

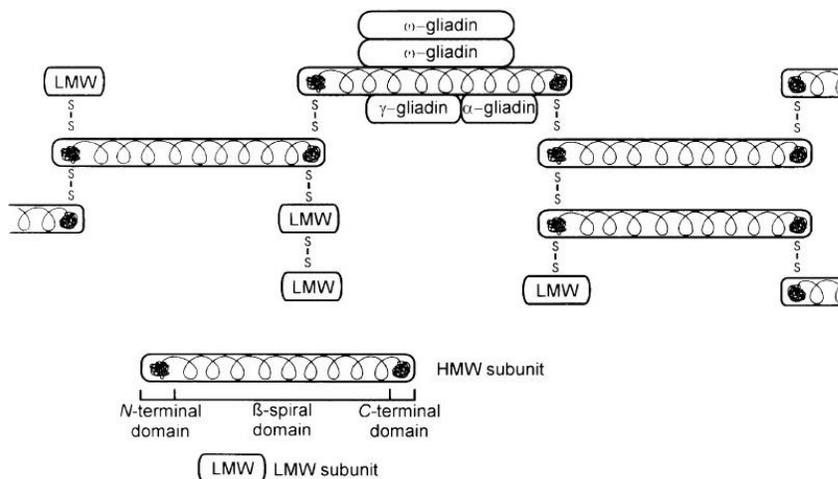


Fig. 16. Esquema de la estructura de la red de gluten (Shewry y col., 2001). LMW: subunidad de glutenina de bajo peso molecular. HMW: subunidad de glutenina de elevado peso molecular. S-S: puentes disulfuro.

glutamina en las HMW-GS es de 1:1 en relación a los aminoácidos restantes presentes en esta fracción (Belton, 1999). Estas subunidades proteicas consisten en un dominio repetitivo central que, por ser rico en β-turns y β-sheets, adopta una conformación supersecundaria inusual conocida como β-espiral (Shewry y col., 2001); y los dominios N- y C- terminal, caracterizados por su estructura de tipo globular, adoptan una conformación α-helical (Rasheed, 2005; Shewry y col., 2001). Las secuencias repetitivas presentan una elevada hidrofobicidad y, debido a la estructura química de la glutamina, poseen la capacidad de formar enlaces puente de hidrógeno intra- e intermoleculares (Belton, 1999). En los dominios terminales se encuentran la mayoría de los residuos de cisteína, que proveen los sitios de formación de puentes disulfuro intermoleculares, posibilitando la

Las subunidades HMW-GS son únicas entre todas las gluteninas en términos de estructura, secuencia de aminoácidos y propiedades funcionales. La proporción de

polimerización característica de estas proteínas (Shewry, 2001). Ambas fracciones proteicas, gliadinas y gluteninas, interactúan entre sí mediante fuerzas no covalentes (Fig. 16), contribuyendo a la viscosidad del gluten.

1.3. Efecto de enzimas endógenas de cereales sobre el macropolímero de gluten

La actividad fermentativa de las bacterias ácido lácticas (BAL) confiere una acidez característica a la masa, y le otorga su denominación de masa ácida o sourdough. Durante la fermentación acidoláctica, y dependiendo del perfil metabólico de cada cepa de BAL, el pH puede descender hasta valores comprendidos entre 3,5 y 4,0. Estos valores coinciden con el pH de activación de proteasas endógenas de harinas de trigo y centeno, cuyo óptimo se encuentra entre 3,0 y 3,5, responsables de la hidrólisis parcial de las proteínas de gluten (Gänzle y col., 2008; Vermeulen y col., 2006). De esta manera, la actividad fermentativa de las BAL modifica la fracción proteica de las harinas, impactando sobre las propiedades reológicas, retención de gas, volumen y textura de masas. A su vez, los eventos proteolíticos ocurridos durante la fermentación proveen los sustratos para la conversión microbiana de aminoácidos en compuestos precursores del flavour (Vermeulen y col., 2006). Algunas cepas de BAL son capaces de hidrolizar de manera directa a las proteínas de gluten, sin embargo, las cepas estudiadas en el presente trabajo de tesis no presentan actividad proteolítica en este sistema (Saiz, 2011); por lo tanto, cualquier cambio ocurrido en el gluten tiene su origen en la actividad enzimática de las harinas. Dentro de estas enzimas se destacan las proteasas aspárticas y las carboxipeptidasas (Gänzle y col., 2008); las primeras catalizan la degradación de proteínas a péptidos, mientras que las peptidasas hidrolizan enlaces peptídicos, escindiendo péptidos a aminoácidos libres (Loponen y col., 2004). Los aminoácidos y péptidos contribuyen al desarrollo de sabores de los alimentos

fermentados y son precursores importantes de los compuestos volátiles del flavour (Gänzle y col., 2008).

De esta manera, se propone estudiar los cambios microestructurales en las proteínas de gluten inducidos por la actividad fermentativa de BAL y por componentes bioactivos presentes en la miel.

2. Resultados

2.1. Efecto de BAL sobre la microestructura de masas

De manera de evaluar el impacto de la actividad fermentativa de BAL sobre la microestructura, masas de trigo-centeno inoculadas con BAL fueron estudiadas utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) a 0 (t_0), 6 (t_6), 12 (t_{12}) y 19 (t_{19}) h de fermentación.

Las muestras de masa sin inocular (control) no exhibieron cambios microestructurales significativos a lo largo del período de incubación (t_0 - t_{19}) (Fig. 17). Las proteínas de gluten se presentaron formando una matriz amorfa y homogénea, con gránulos de almidón de forma esférica u ovalada de 5 a 20 μm de diámetro.

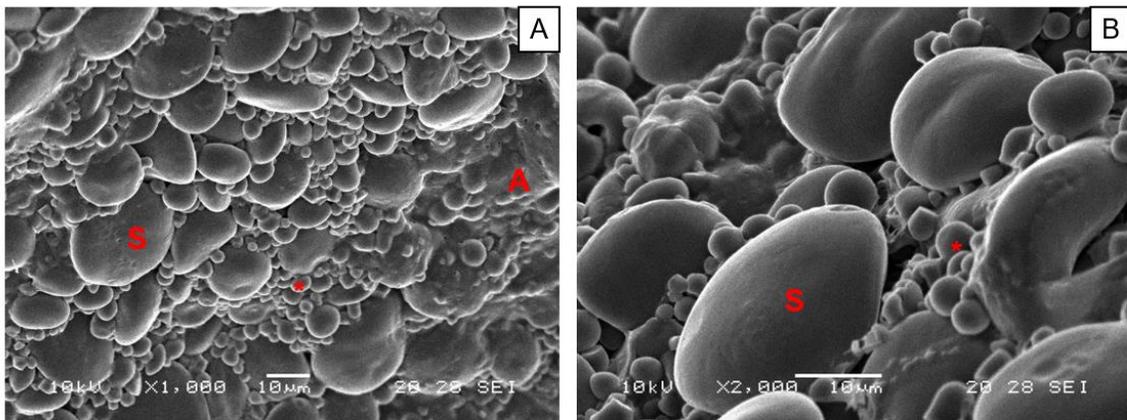


Fig. 17. Micrografías electrónicas de barrido de masas control: (A) 0 h y (B) 19 h de incubación. A: matriz amorfa; S: gránulo de almidón de ~ 20 μm ; Asterisco (*): gránulo de almidón de ~ 5 μm .

Durante las primeras 6 h de fermentación las muestras de masa inoculadas con BAL presentaron una microestructura semejante a la observada en masas control (Figs. 18, 19, 20, 21: A y B), los gránulos de almidón se presentaron embebidos en una matriz de proteína

amorfa. Fueron necesarias 12 h de fermentación para que se indujeran cambios microestructurales significativos en el MPG.

2.1.1. *L. bulgaricus*

Luego de 12 h de fermentación utilizando *L. bulgaricus*, la matriz de gluten exhibió un aspecto más abierto, con un desarrollo incipiente de fibras cuyo espesor promedio fue 1 μm (Fig. 18 C). Estas características de microestructura otorgaron al gluten un aspecto poroso, que fue vinculado a la despolimerización, es decir, a la hidrólisis parcial del MPG para formar subunidades de menor peso molecular. Conforme transcurrió el período fermentativo (t_{19}), se produjeron cambios sustanciales en la microestructura (Fig. 18 D), la hidrólisis de gluten fue aún más marcada, formando una red regular de fibras de aproximadamente 3 μm de espesor. En coincidencia con los resultados obtenidos por numerosos autores (Bleukx y Delcour, 2000; Clarke y col., 2004 Vermeulen y col., 2006), la despolimerización del MPG estuvo asociada al incremento de acidez durante la fermentación acidoláctica. Entre 12 y 19 h de incubación el pH alcanzó los valores óptimos

de activación de proteasas endógenas de cereales, las cuales son responsables de la hidrólisis de estas proteínas.

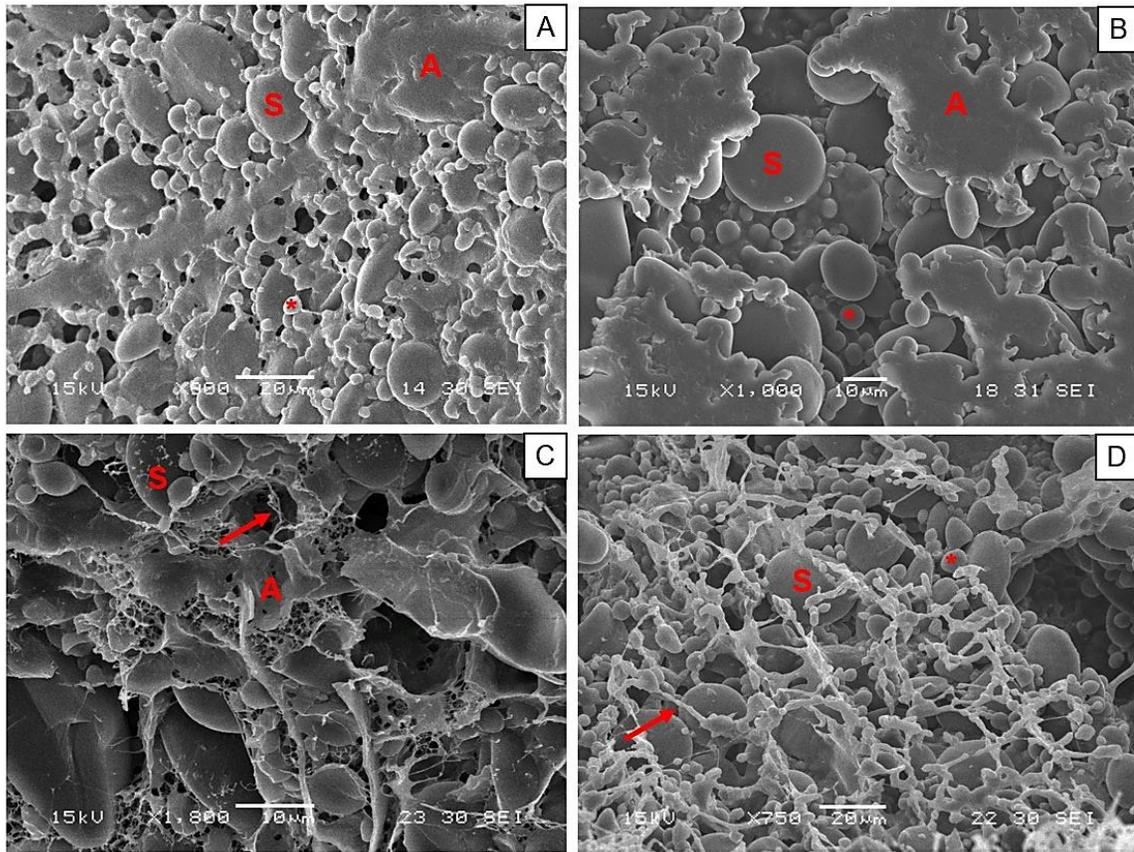


Fig. 18. Micrografías electrónicas de barrido de masas inoculadas con *L. bulgaricus* a (A) 0, (B) 6, (C) 12 y (D) 19 h de fermentación. A: gluten amorfo; S: gránulo de almidón de ~20 µm; Asterisco (*): gránulo de almidón de ~ 5 µm; Flechas rojas: fibras de gluten.

2.1.2. *L. fermentum*

En las micrografías de masas inoculadas con *L. fermentum* se observaron cavidades correspondientes a burbujas de dióxido de carbono (CO₂) (Fig. 19 B), uno de los productos del metabolismo heteroláctico exhibido por esta cepa, así la masa exhibió un aspecto más abierto. Luego de 12 h de incubación, la despolimerización del MPG produjo una matriz proteica extendida y la formación de fibras cuyo espesor estuvo comprendido entre 2 y 20

μm (Fig. 19 C). Transcurridas 19 h de fermentación, las fibras sufrieron una disgregación completa y, en consecuencia, el gluten adquirió un aspecto discontinuo (Fig. 19 D). El grado de hidrólisis experimentado por las proteínas de gluten no puede ser explicado únicamente por la actividad de proteasas pH-dependientes propias de las harinas. Agentes reductores, como el glutatión (GSH), frecuentemente encontrados en harinas de trigo, poseen la capacidad para reducir enlaces disulfuro (SS). Como resultado de esta reacción, se forman polímeros de menor peso molecular y glutatión oxidado (GSSG) (Wieser y col., 2007). Las especies heterolácticas, como *L. fermentum*, son capaces de expresar glutatión reductasa, enzima que cataliza la reducción del GSSG a GSH (Gänzle y col., 2008). Así, el agente reductor es regenerado, pudiendo actuar nuevamente sobre los puentes disulfuro y, por lo tanto, es capaz de promover un mayor grado de hidrólisis. En concordancia con una red de gluten disgregada, ensayos reológicos realizados por Saiz (2011) sobre masas fermentadas con esta cepa, mostraron una disminución significativa del módulo elástico.

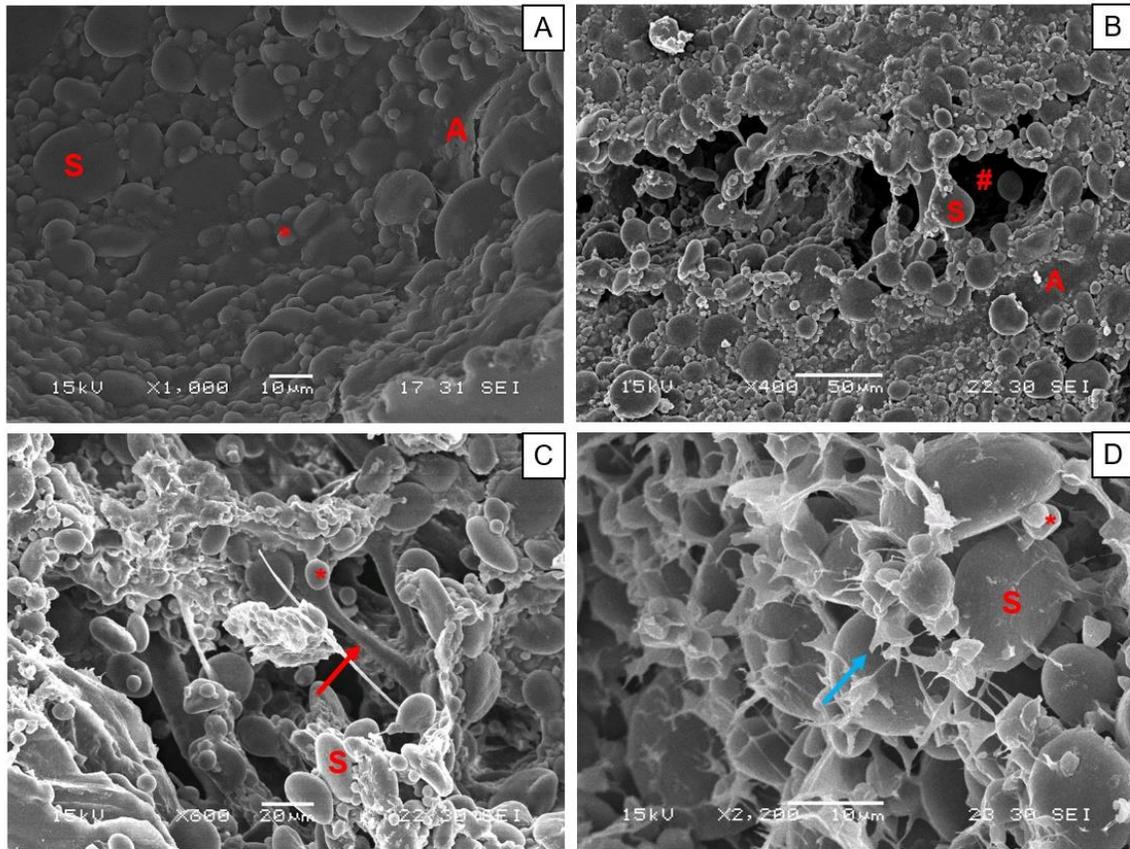


Fig. 19. Micrografías electrónicas de barrido de masas inoculadas con *L. fermentum* a (A) 0, (B) 6, (C) 12 y (D) 19 h de fermentación. A: matriz amorfa; S: gránulo de almidón de ~ 20 μm ; Asterisco (*): gránulo de almidón de ~ 5 μm ; Numeral (#): burbujas de CO_2 ; Flechas rojas: fibra de gluten; Flechas azules: gluten desagregado.

2.1.3. *L. plantarum*

En masas fermentadas con *L. plantarum* (t_{12}), la disposición espacial del MPG consistió en una lámina de proteína extendida (Fig. 20 C), y se diferenció marcadamente de la microestructura de masas inoculadas con el resto de las cepas. Algunas regiones presentaron fibras delgadas de proteína cuyo espesor aproximado fue 0,6 μm . A 19 h de incubación, el gluten prevaleció como una lámina desplegada que cubrió los gránulos de almidón. Esta cepa fue la más acidificante; produjo la concentración más elevada de ácidos orgánicos a lo largo del período fermentativo (t_{19} : pH 3,72; TTA 16,3 ml NaOH 0,1 M). Ha

sido reportado que una concentración elevada de protones favorece la repulsión entre subunidades de glutenina, lo cual permite la formación de puentes de hidrógeno entre residuos de aminoácidos y moléculas de agua (Clarke y col., 2001). Así, la proteína solvatada permite el desarrollo de microestructuras de tipo laminar.

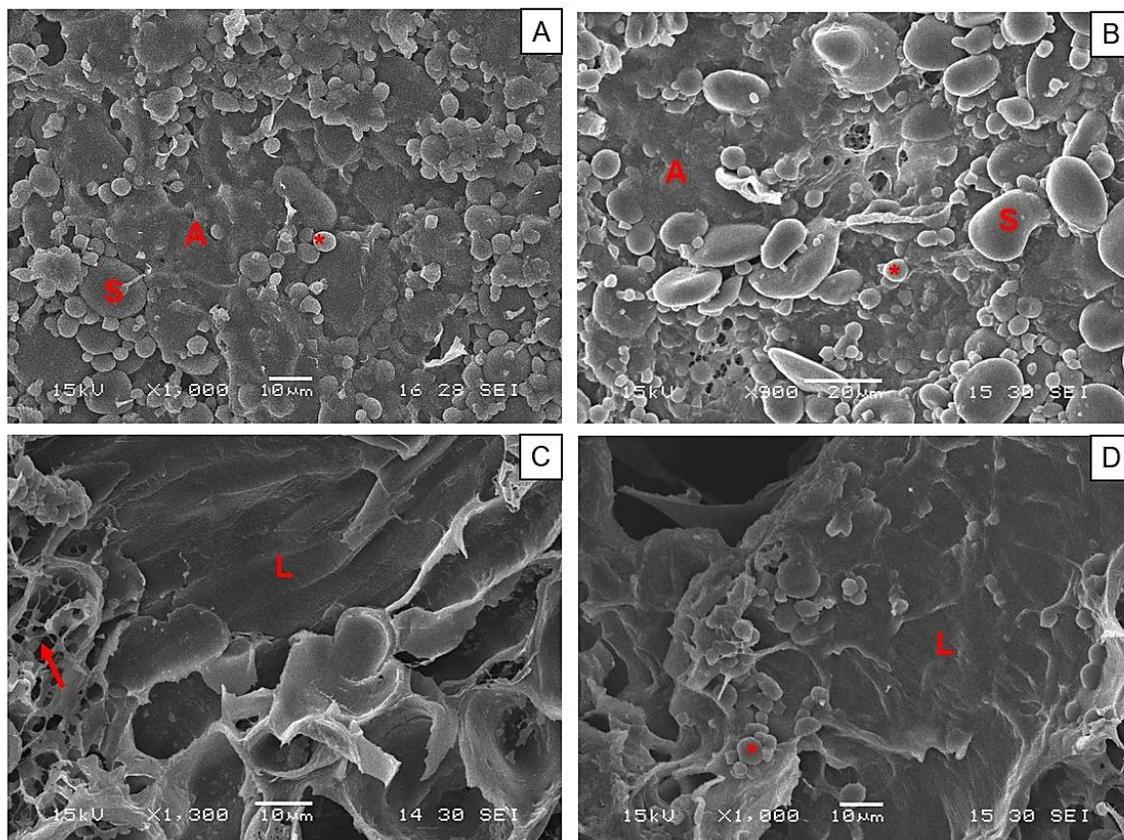


Fig. 20. Micrografías electrónicas de barrido de masas inoculadas con *L. plantarum* a (A) 0, (B) 6, (C) 12 y (D) 19 h de fermentación. A: gluten amorfo; S: gránulo de almidón de ~20 μm ; Asterisco (*): gránulo de almidón de ~ 5 μm ; L: lámina de gluten; Flechas rojas: fibras de gluten.

2.1.4. *P. pentosaceus*

La microestructura del MPG de masas inoculadas con *P. pentosaceus* fue notablemente modificada luego de 12 h de incubación. La matriz de gluten se desarrolló como una estructura proteica menos densa, en la cual se observaron fibras de espesor

aproximado a 2 μm (Fig. 21 C). Los cambios microestructurales más importantes ocurrieron luego de 19 h de incubación; el gluten se presentó formando una red tridimensional de fibras, con un espesor promedio de 2,5 μm (Fig. 21 D), semejante a la red observada en masas fermentadas por *L. bulgaricus*.

P. pentosaceus fue la segunda cepa más acidificante de las cuatro estudiadas, el descenso significativo en los valores de pH observados a 12 h de fermentación coincidió con los cambios de microestructura observados (t_{12}). Es importante destacar que, si bien *L. plantarum* y *P. pentosaceus* exhibieron las pendientes de acidificación más pronunciadas, el MPG de ambas masas adoptó disposiciones espaciales bien diferenciadas; en el primer caso se observó un predominio de láminas y el segundo estuvo caracterizado por una red de fibras tridimensional.

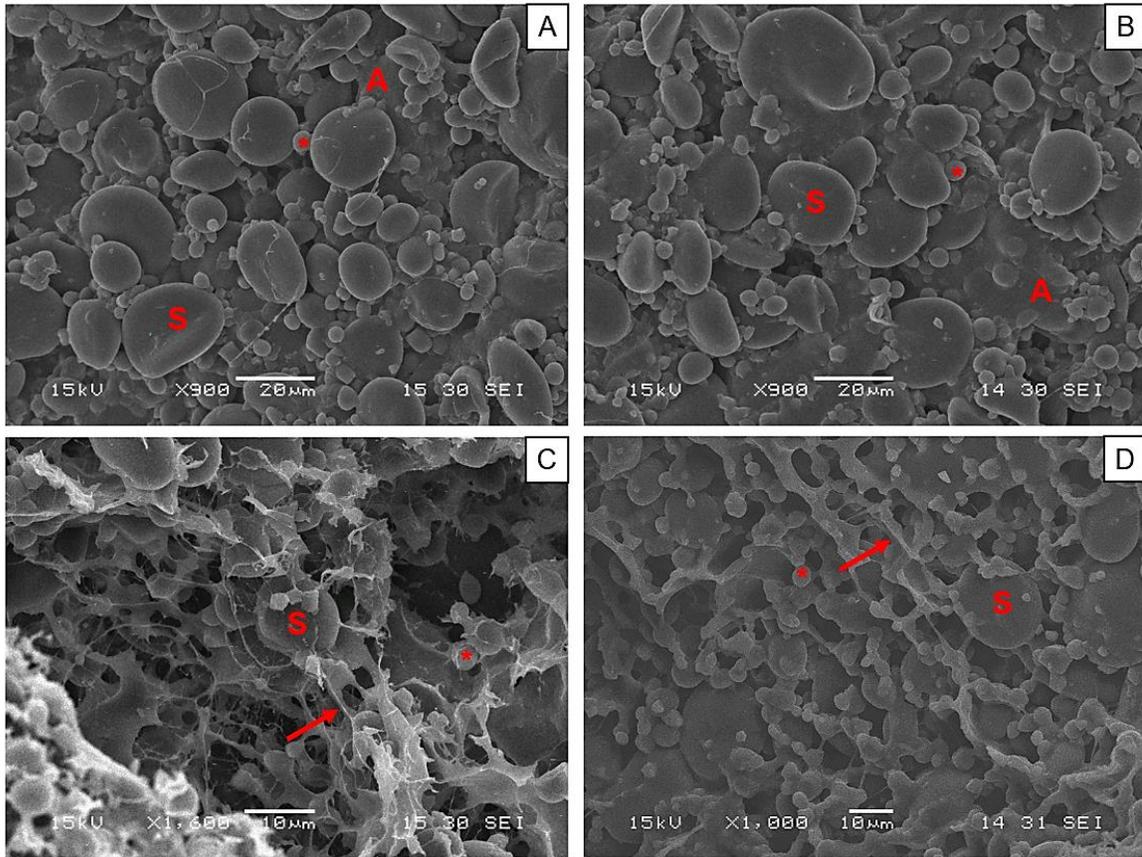


Fig. 21. Micrografías electrónicas de barrido de masas inoculadas con *P. pentosaceus* a (A) 0, (B) 6, (C) 12 y (D) 19 h de fermentación. A: matriz amorfa; S: gránulo de almidón de ~20 µm; Asterisco (*): gránulo de almidón de ~ 5 µm; Flechas rojas: fibras de gluten.

Los cambios de microestructura observados en el MPG son el resultado de numerosos eventos desencadenados en un sistema tan complejo como es una masa ácida. Éstos fueron consistentes con el grado de acidificación producido en masas luego de 12 h de fermentación; los valores de pH (3,7-4,5) se acercaron a los óptimos de activación de enzimas endógenas de harinas de trigo y centeno (pH 3,0-3,5), consideradas las principales responsables de la hidrólisis de proteínas de gluten. Como resultado se forman polímeros de menor peso molecular (Gänzle y col., 2008) que, en base a las micrografías obtenidas, son reordenados en el sistema y conducen al desarrollo de estructuras definidas, como fibras y láminas. Por otra parte, un exceso de hidrólisis sobre el MPG, como se observó en

masas fermentadas por *L. fermentum*, produjo una disgregación extrema que afecta sus propiedades viscoelásticas.

2.2. Efecto de BAL sobre la microestructura de masas suplementadas con miel

Con el objetivo de estudiar el efecto ejercido por la miel sobre la microestructura de masas ácidas, se prepararon masas a partir de harinas de trigo-centeno, miel (6,5% p/p) y el respectivo inóculo de BAL. Ha sido previamente comprobado, mediante estudios *in vitro*, que la miel de *Prosopis* spp, en concentraciones inferiores a 25 % (p/v) promueve el crecimiento de BAL (Nutter y col., 2016).

En primer lugar, se evaluó el efecto que ejerce la miel *per se* sobre la microestructura de gluten. Se prepararon masas de acuerdo a lo indicado anteriormente, exceptuando el agregado de inóculo bacteriano, las cuales fueron incubadas durante 19 h. A lo largo del período de incubación (t_0 - t_{19}), el gluten se presentó como una red densa hiperconectada de proteína (Fig. 22), cuyo aspecto se diferenció notablemente de la matriz amorfa observada en masas sin miel. Al finalizar el período de incubación (t_{19}), se observaron fibras de alrededor de 10 μm de espesor, las cuales no estuvieron presentes en masas control. Para poder explicar este comportamiento es importante mencionar que la miel es una fuente de numerosas enzimas y compuestos bioactivos, entre los cuales se destaca la glucosa oxidasa (GOX). Esta enzima ha atraído gran interés en procesos de mejoramiento de masas de trigo, siendo propuesta como reemplazo de aditivos químicos (Rasiah y col., 2005; Dunnewind y col., 2002). Los mecanismos por los cuales la GOX actúa sobre las proteínas de gluten han sido estudiados pero no completamente resueltos. Se ha reportado que el carácter oxidante de uno de sus productos catalíticos, el peróxido de hidrógeno

(H₂O₂), promueve la oxidación de los grupos sulfhidrido libres entre residuos de cisteína, haciendo posible el entrecruzamiento y polimerización (Miller y Hosenev, 1999).

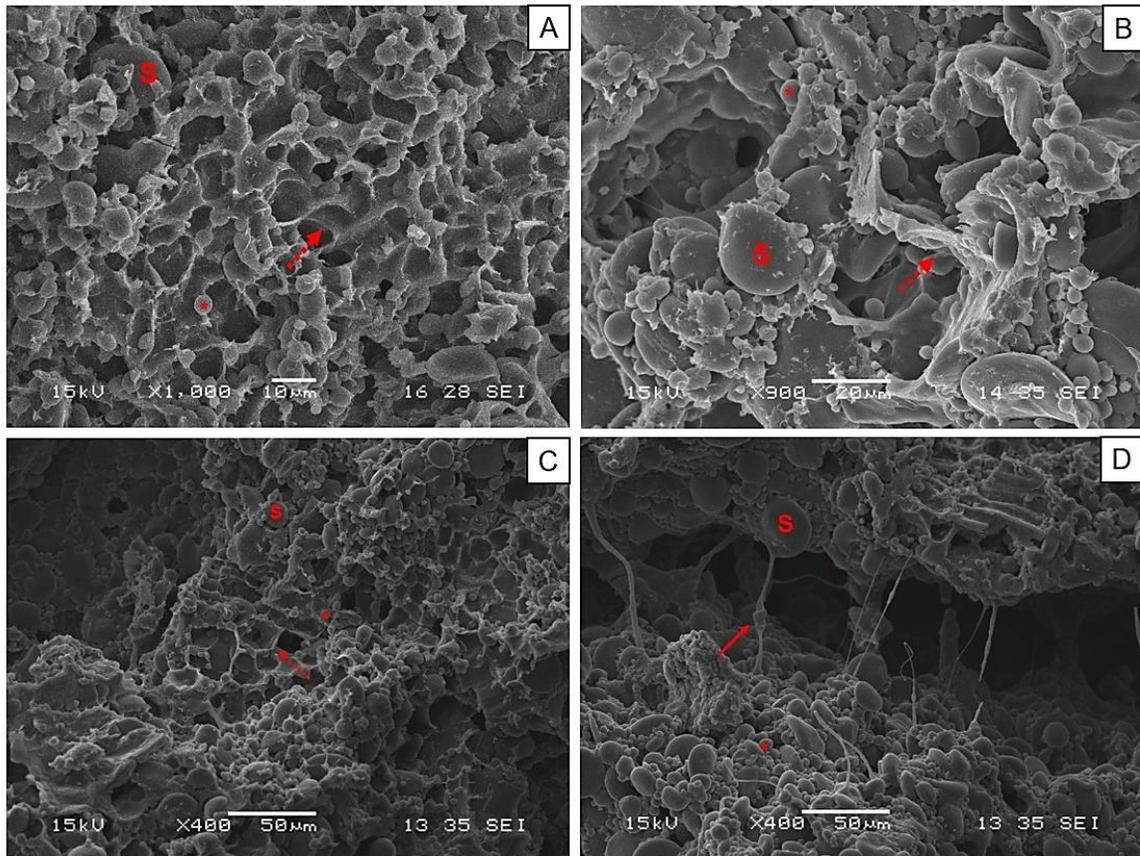


Fig. 22. Micrografías electrónicas de barrido de masas con miel sin inocular a (A) 0, (B) 6, (C) 12 y (D) 19 h de incubación. A: matriz amorfa; S: gránulo de almidón de ~20 µm; Asterisco (*): gránulo de almidón de ~ 5 µm; Flechas rojas: fibras de gluten. Flechas discontinuas: matriz hiperconectada de proteína.

Por otro lado, durante las primeras 6 h de incubación, las proteínas de gluten de masas con miel e inoculadas con BAL también se presentaron como una red hiperconectada de proteína, confirmando que la miel introduce modificaciones en la microestructura del MPG.

2.2.1. *L. bulgaricus*

Durante el período fermentativo (t_{12} - t_{19}), el gluten adquirió un aspecto de lámina gruesa extendida (Fig. 23), diferenciándose completamente de las estructuras formadas en masas inoculadas con *L. bulgaricus* sin miel, que consistieron en una red de fibras de gluten. Evidentemente, los componentes aportados por la miel, como azúcares, enzimas, H_2O_2 y otros compuestos bioactivos, son determinantes de la microestructura adoptada por el MPG.

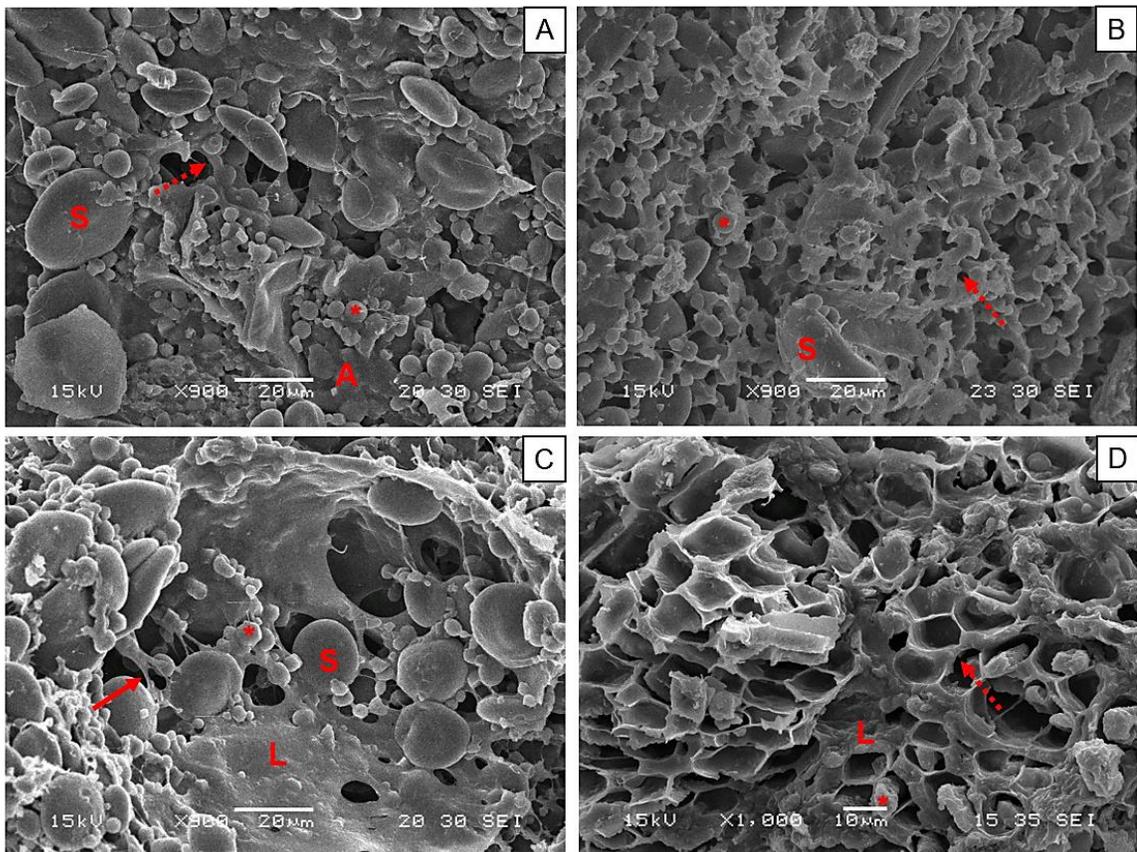


Fig. 23. Micrografías electrónicas de barrido de masas con miel inoculadas con *L. bulgaricus* a (A) 0, (B) 6, (C) 12 y (D) 19 h de incubación. A: matriz amorfa; S: gránulo de almidón de ~20 µm; Asterisco (*): gránulo de almidón de ~5 µm; L: lámina de gluten; Flechas rojas: fibras de gluten. Flechas discontinuas: matriz hiperconectada de proteína.

2.2.2. *L. fermentum*

La microestructura de masas con miel e inoculadas con *L. fermentum* se diferenci6 ampliamente de aquella observada en masas fermentadas sin miel. A partir de 6 h de fermentaci6n, la matriz de gluten se present6 como una red hiperconectada de prote6na con numerosas fibras, y as6 se mantuvo durante las 19 h de incubaci6n (Fig. 24). Teniendo en cuenta que la actividad de *L. fermentum* hab6a modificado la red de gluten hasta su desagregaci6n, podemos concluir que la inclusi6n de miel indujo la formaci6n de una red cohesiva de prote6na, evitando la hidr6lisis excesiva del MPG.

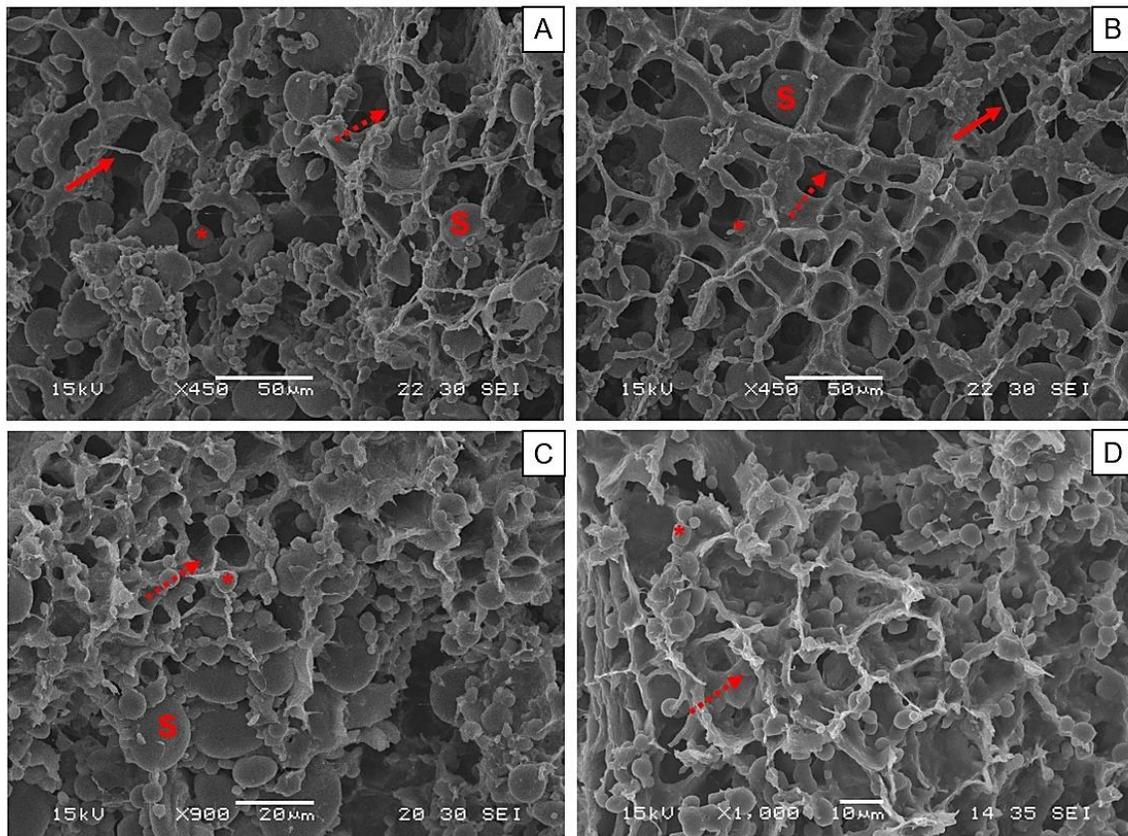


Fig. 24. Micrograf6as electr6nicas de barrido de masas con miel inoculadas con *L. fermentum* a (A) 0, (B) 6, (C) 12 y (D) 19 h de incubaci6n. A: matriz amorfa; S: gr6nulo de almid6n de ~ 20 µm; Asterisco (*): gr6nulo de almid6n de ~ 5 µm; Flechas rojas: fibras de gluten. Flechas discontinuas: matriz hiperconectada de prote6na.

2.2.3. *L. plantarum*

Las características de microestructura de masas fermentadas con *L. plantarum* con y sin agregado de miel fueron semejantes, mostrando un predominio de lámina solvatada de proteína (Fig. 25). Al igual que en las otras masas suplementadas con miel, se observó una red hiperconectada de proteína.

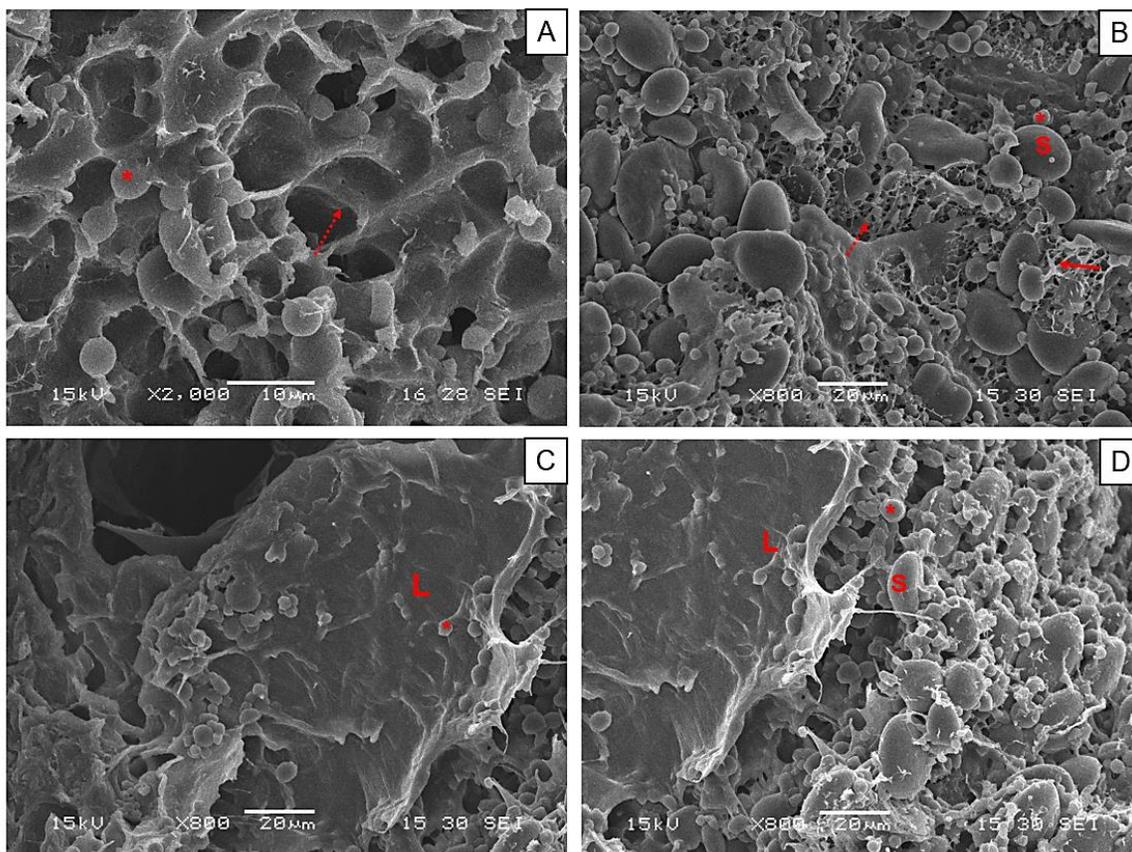


Fig. 25. Micrografías electrónicas de barrido de masas con miel inoculadas con *L. plantarum* a (A) 0, (B) 6, (C) 12 y (D) 19 h de fermentación. A: gluten amorfo; S: gránulo de almidón de ~20 μm; Asterisco (*): gránulo de almidón de ~ 5 μm; L: lámina de gluten; Flechas rojas: fibras de gluten; Flechas discontinuas: matriz hiperconectada de proteína.

2.2.4. *P. pentosaceus*

Transcurridas las primeras 6 h de incubación, el gluten de masas con miel fermentadas por *P. pentosaceus* exhibió un aspecto poroso, con un desarrollo incipiente de fibras (Fig. 26 B). Durante la fermentación se vio favorecida la despolimerización del gluten hacia la formación de fibras (Fig. 25 D). Sin embargo, éstas no se dispusieron formando una red regular, como ocurrió en masas sin miel inoculadas por esta cepa.

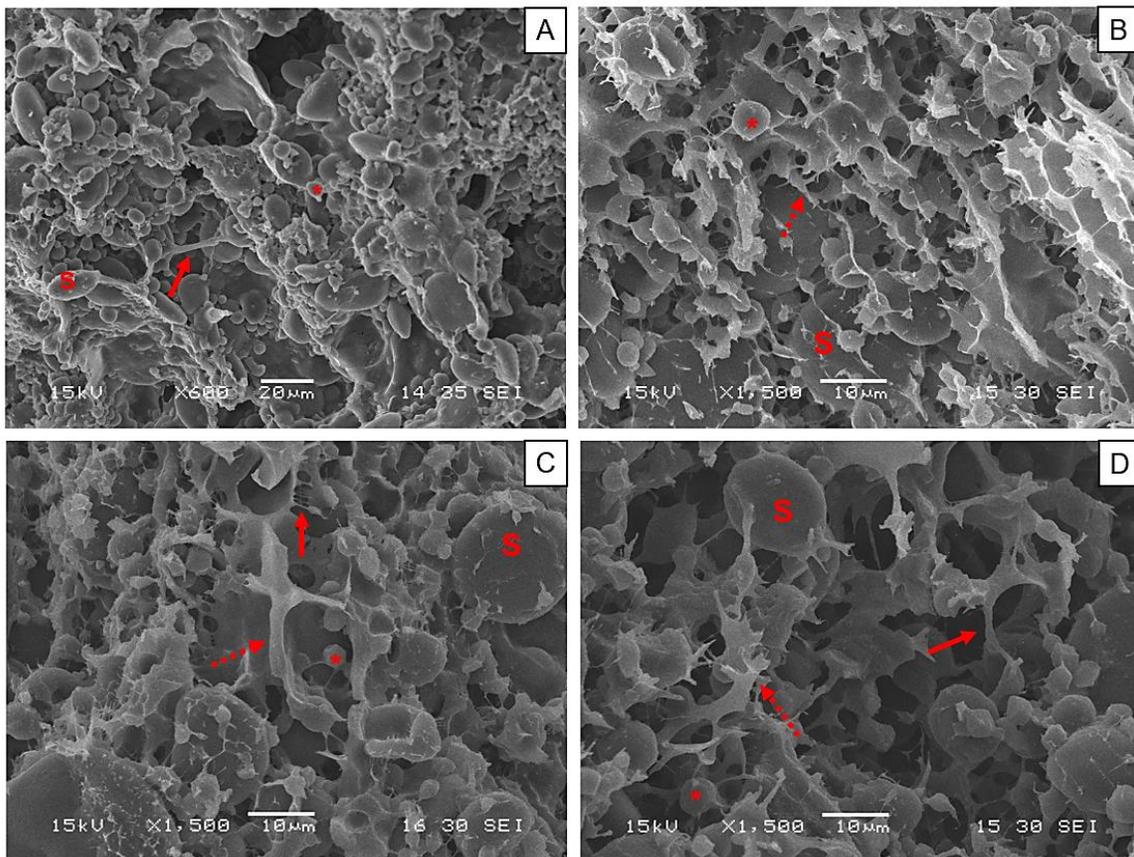


Fig. 26. Micrografías electrónicas de barrido de masas con miel inoculadas con *P. pentosaceus* a (A) 0, (B) 6, (C) 12 y (D) 19 h de incubación. A: matriz amorfa; S: gránulo de almidón de ~20 μm ; Asterisco (*): gránulo de almidón de ~5 μm ; Flechas rojas: fibras de gluten. Flechas discontinuas: matriz hiperconectada de proteína.

En todas las muestras estudiadas, la presencia de miel modificó la microestructura de gluten desde el t_0 , cambiando el aspecto amorfo de la matriz por una red densa de proteína. A partir de los resultados micrográficos obtenidos, fue posible inferir que la presencia de miel condicionó, en cierta medida, la actividad de proteasas endógenas provenientes de las harinas y/o la actividad reductora de GSH sobre las proteínas de gluten. Este efecto fue notable en masas inoculadas con *L. fermentum*, en las cuales el agregado transformó una matriz disgregada o discontinua de gluten en una microestructura más cohesiva. Asimismo, en presencia de miel, las fibras no adoptaron el ordenamiento espacial regular de tipo red, observado en masas fermentadas por *L. bulgaricus* y *P. pentosaceus*. Por su parte, la formación de estructuras laminares no se vio afectada, sino que, por el contrario, fue promovida. En este sentido es posible hipotetizar que la concentración de grupos OH provenientes de los azúcares promueve las interacciones con el agua y, por lo tanto, la formación de estructuras solvatadas; al mismo tiempo dificulta la interacción intercadena que caracteriza la formación de fibras. La prevalencia de uno u otro evento dependerá del desplegamiento de proteína según la BAL empleada.

3. Conclusiones

Los cambios observados en la microestructura de masas ácidas durante el proceso de fermentación pueden tener consecuencias deseables, como el desarrollo de una red de fibras y/o estructuras laminares de proteína. Sin embargo, la actividad de ciertas BAL, como *L. fermentum*, puede tener efectos adversos en lo que respecta a la reología del producto final, al producir una despolimerización excesiva de las proteínas de gluten. En todos los casos, los cambios están asociados no solo al perfil fermentativo de cada cepa, sino también a la actividad enzimática características de cada especie. Adicionalmente, el agregado de una matriz rica en compuestos bioactivos, como la miel, introdujo cambios microestructurales en el gluten y condicionó la formación de la microestructura generada por la actividad de BAL. La presencia de miel promueve entrecruzamientos efectivos entre proteínas, capaces de minimizar o limitar la hidrólisis del MPG. De esta manera, la optimización de un producto fermentado depende de la naturaleza del microorganismo a utilizar y de las potenciales modificaciones que pueden inducir los aditivos agregados.

CAPÍTULO VI

CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA SECUNDARIA
Y Terciaria DE LAS PROTEÍNAS DE
GLUTEN

1. Introducción

1.1. Proteínas: estructuras primaria, secundaria y terciaria

Las proteínas son polímeros biológicos formados a partir de diferentes combinaciones de sus 20 monómeros, los aminoácidos, formados por un carbono alfa ($C\alpha$) unido covalentemente a: un átomo de hidrógeno, un carbono carboxílico, un nitrógeno amínico y un residuo específico o grupo lateral de cada aminoácido (R) (Fig. 27). La estructura primaria de las proteínas comprende la secuencia lineal de aminoácidos unidos mediante enlaces amida, ampliamente conocidos como enlaces peptídicos (Gallagher, 1997). Químicamente, el enlace peptídico consiste de un enlace covalente que ha sido formado como resultado de una reacción de condensación entre un ácido carboxílico y un grupo amino de dos aminoácidos, con la consecuente pérdida de una molécula de agua (Fig. 28) (Petsko y Ringe, 2004).

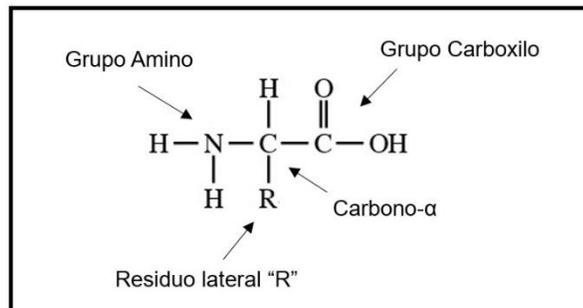


Fig. 27. Estructura de un aminoácido, unidad básica necesaria para la formación de las proteínas (Gallagher, 1997).

El aminoácido más abundante en las proteínas de gluten es la glutamina, y junto con la prolina y glicina conforman más del 50% de los aminoácidos presentes en el gluten.

Esta característica limita los tipos de estructuras secundarias que pueden adoptar las proteínas de gluten, especialmente si los tres aminoácidos tienden a localizarse en posiciones conservadas dentro de modos repetitivos en el polímero (Shewry y col., 2001). Otros de los aminoácidos

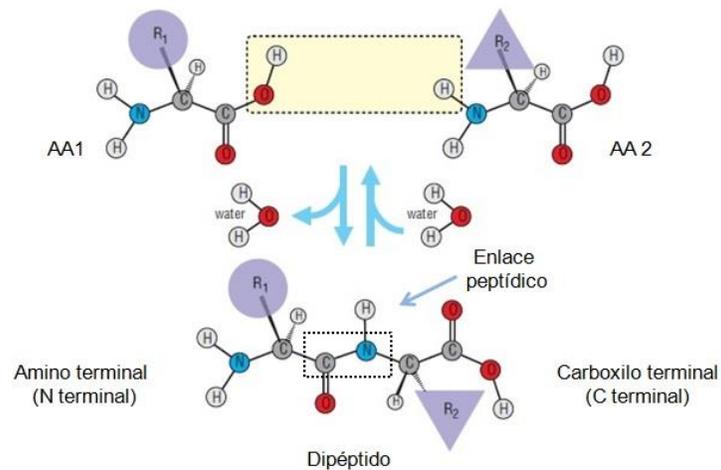


Fig. 28. Reacción de formación e hidrólisis del enlace peptídico. La formación (de arriba hacia abajo) y la hidrólisis (de abajo hacia arriba) del enlace peptídico requiere la pérdida y adición, respectivamente, de una molécula de agua (Petsko y Ringe, 2004).

frecuentemente encontrados en las proteínas de gluten son triptófano, cisteína y tirosina. La cisteína se localiza preferentemente en los dominios no repetitivos N- y C- terminal de las gluteninas, mientras que la tirosina se encuentra en los dominios repetitivos tirosina-tirosina-prolina-treonina-serina (YYPTS) de las subunidades de glutenina de elevado peso molecular (HMW-GS) (Tilley y col., 2001). Estos dos aminoácidos participan de la formación de enlaces intermoleculares que estabilizan a las proteínas de gluten, requisito necesario para posibilitar su polimerización; al tiempo que, contribuyen con la formación de la estructura cuaternaria de estas proteínas (Shewry y col., 2001; Tilley y col., 2001). Por oxidación de grupos tiol libres (SH), la cisteína puede formar tanto enlaces intra- como inter-cadena (Shewry y col., 2001). Mientras que, los enlaces ditirosina solo pueden ocurrir entre dos cadenas polipeptídicas, dado que existen impedimentos estéricos entre residuos tirosina ubicados adyacentemente (Tilley y col., 2001) (Fig. 29).

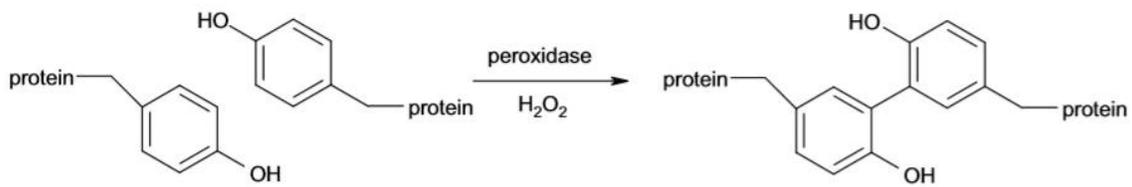


Fig. 29. Mecanismo de formación de enlaces ditirosina (Joye y col., 2009).

La naturaleza de los grupos laterales de los aminoácidos que conforman la estructura primaria de las proteínas determina la forma en que puede plegarse la cadena polipeptídica. Estos grupos poseen diferentes tendencias a interactuar entre sí y con moléculas de agua, de acuerdo se trate de residuos de naturaleza hidrofóbica, hidrofílica o anfipática, contribuyendo a la estabilidad y función proteica (Petsko y Ringe, 2004).

En condiciones fisiológicas, las cadenas laterales hidrofóbicas de aminoácidos neutros no polares, como fenilalanina e isoleucina, se encuentran inmersas en el interior de la proteína formando una estructura compacta, de manera de minimizar el contacto con el agua. Dentro del “core” hidrofóbico los grupos no polares pueden interactuar a través de fuerzas de Van der Waals; mientras que, los grupos aromáticos presentes en fenilalanina y tirosina suelen empaquetarse juntos. Por otra parte, debido a su carácter hidrófilo, los aminoácidos ácidos y básicos se encuentran en la superficie de la proteína e interactúan con moléculas de agua a través de puentes de hidrógeno. El plegamiento de los grupos hidrofóbicos acerca inevitablemente la cadena polipeptídica principal, o *backbone*, que contiene a los grupos amino (NH) y carbonilo (C=O), hacia el *core* hidrofóbico (Gallagher, 1997; Murray y col., 2017). Es así como la cadena polipeptídica forma enlaces puente de hidrógeno consigo misma generando segmentos que se repiten regularmente, determinando, así, la estructura secundaria de las proteínas. Han sido definidos tres tipos principales de estructura secundaria: α -hélice, β -sheet y β -turn (Petsko y Ringe, 2004). La conformación α -hélice surge a partir de la interacción intracadena entre el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de un aminoácido (n) y un átomo de hidrógeno perteneciente al grupo amino de un aminoácido localizado a cuatro residuos de distancia (n+4), formando una estructura cilíndrica (Fig. 30). Si

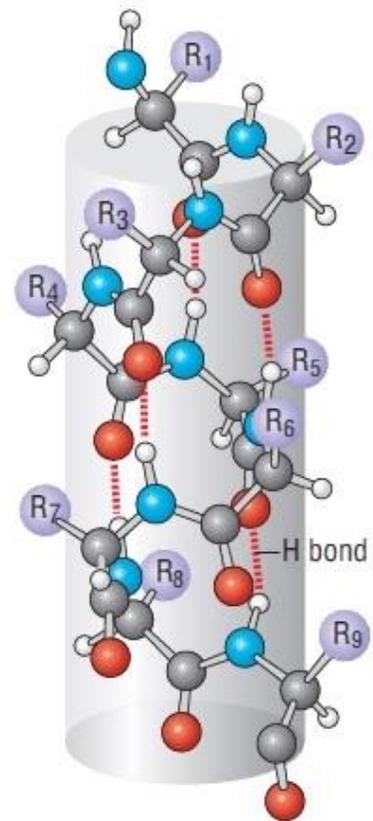


Fig. 30. Estructura α -hélice. Formación de enlaces puentes de hidrógeno (línea roja punteada) entre átomos de oxígeno (rojo) e hidrógeno (blanco) de los grupos carbonilo y amino, respectivamente (Petsko y Ringe, 2004).

bien cualquier aminoácido puede estar formando parte de una α -hélice, existe una

tendencia denominada “propensión a la hélice”, en donde la prolina y glicina son los aminoácidos menos propensos a aparecer en la misma. En el caso de la prolina, el átomo de nitrógeno de su enlace peptídico no tiene unido un átomo de hidrógeno para formar un enlace puente de hidrógeno con el aminoácido en (n+4). Además, el metileno unido al nitrógeno del enlace peptídico también provoca impedimentos estéricos que hacen que la hélice tienda a romperse en el punto donde se encuentra la prolina. Prolina y glicina predominan en la estructura primaria de gluteninas y abundan en conformaciones de tipo β , especialmente en β -turns (Shewry y col., 2001). Los dominios N- y C- terminal de las gluteninas están estabilizados por enlaces disulfuro intercadena formados entre residuos cisteína, y consisten predominantemente de estructuras α -hélices (Tilley y col., 2001). Adicionalmente, cuando una molécula de agua se inserta en la estructura helicoidal se establecen puentes de hidrógeno entre ella y los oxígenos carbonílicos de la proteína, en consecuencia, la hélice se distorsiona y define la formación de una hélice solvatada (Murray y col., 2017; Petsko y Ringe, 2004, Yamamoto y col., 2014).

Por otro lado, la conformación β -sheet surge cuando dos segmentos polipeptídicos, llamados β -strands, o hebras- β , establecen puentes de hidrógeno entre sí, generando un modelo específico de interacciones que conduce a la formación de una estructura plegada

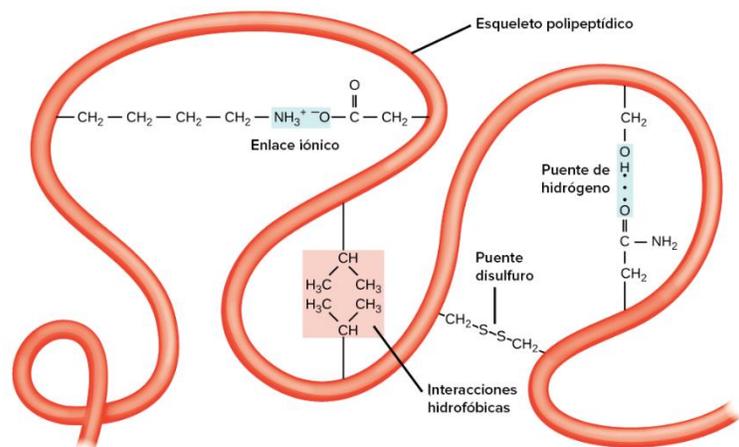


Fig. 31. Tipos de interacciones establecidas entre aminoácidos en una cadena polipeptídica (Petsko y Ringe, 2004).

(Zhang y col., 2009). Estos enlaces no covalentes, junto a las fuerzas de Van der Waals, confieren estabilidad a la estructura β -sheet (Murray y col., 2017). Las hebras- β adyacentes acercan a los residuos de aminoácidos

que se encuentran distantes, generando un modelo específico de interacciones que produce el apareamiento entre los mismos, formando la estructura β -sheet (Zhang y col., 2009). La conformación β -sheet puede tener una conformación *paralela*, cuando los grupos N- terminal de ambas hebras se encuentran en el mismo extremo, o *antiparalela*, si los grupos N- terminal de ambas cadenas están en extremos opuestos (Fig. 31) (Petsko y Ringer, 2004). Entre los tipos de fuerzas que pueden interactuar entre dos hebras- β se incluyen puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacción electrostática, enlaces iónicos, efecto hidrofóbico (Fig. 32); y entre ellas, el efecto hidrofóbico es el más importante (Parisien y col., 2007).

Los aminoácidos voluminosos, tirosina, fenilalanina, triptófano, junto con los residuos treonina, valina e isoleucina son propensos a formar parte de la región central de las estructuras β -sheets. En tanto, la prolina es frecuentemente encontrada formando parte de los extremos de esta conformación (Bhattacharjee y Biswas, 2010). Una característica particular de las hebras- β antiparalelas es que favorecen la formación de puentes disulfuro entre dos residuos cisteína. (Fooks y col., 2006; Harrison y col., 1996). Este comportamiento se debe a que la cisteína adopta posiciones C- y N-terminal que posibilitan los entrecruzamientos entre residuos de cisteína sólo en la conformación β -antiparalela. En la conformación β -paralela, los residuos tiol laterales ubicados en cadenas adyacentes no

se encontrarían geoméricamente predispuestos para la interacción de puentes disulfuro (Bhattacharje y Biswas, 2010).

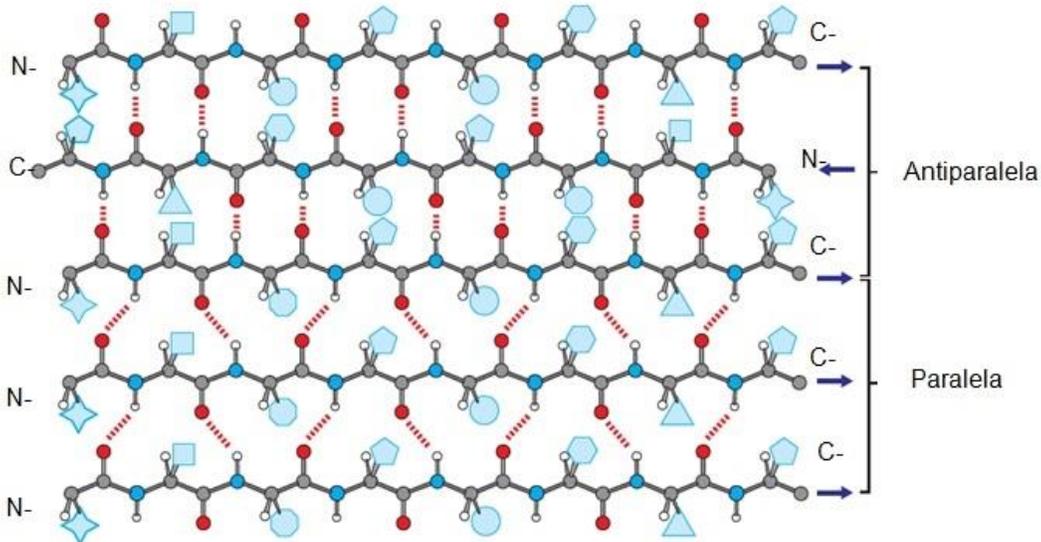


Fig. 32. Estructura β -sheet en las conformaciones paralela y antiparalela (Petsko y Ringe, 2004). Círculo rojo: oxígeno; azul: nitrógeno; gris: carbono; blanco: hidrógeno; figuras geométricas: cadena lateral del aminoácido; línea punteada: puente de hidrógeno.

Otra de las estructuras secundarias de importancia en las proteínas son los giros- β , o β -turns (Fig 33). En esta estructura, la cadena polipeptídica se pliega sobre sí misma en un ángulo de aproximadamente 180 grados, cambiando su dirección. Este giro comprende la interacción por puente de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico de un residuo (n) y el grupo amino del residuo n+3, revirtiendo la dirección de la cadena. Las moléculas de agua pueden donar y aceptar puentes de hidrógeno a estos grupos, de manera que los β -turns suelen

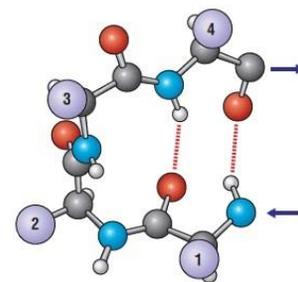


Fig. 33. Estructura secundaria β -turn (Petsko y Ringe, 2004).

encontrarse en la superficie de las proteínas plegadas (Murray y col., 2017, Petsko y Ringe,

2004). Por otra parte, los polímeros pueden presentarse formando arreglos en donde sus monómeros se encuentran orientados de manera aleatoria; en este caso no se trata de una estructura secundaria, sino de una distribución estadística conocida como estructura desordenada o *random coil* (Smith y col., 1996).

La estructura terciaria es la forma tridimensional adoptada por una proteína cuando ésta se pliega sobre sí misma. Esta estructura es estabilizada por interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos, y es responsable de la función biológica de las proteínas. Por otra parte, la formación de enlaces disulfuro entre residuos cisteína resultan fundamentales en la estabilización de la estructura terciaria de las proteínas, permitiendo que diferentes partes de la misma se mantengan covalentemente unidas. Adicionalmente, se pueden establecer puentes de hidrógeno entre diferentes cadenas laterales de los aminoácidos que componen la proteína, contribuyendo con su estabilidad (Gallagher, 1997; Murray y col., 2017).

1.2. Estructuras secundaria y terciaria de las proteínas de gluten: Espectroscopía Raman

La cristalografía de rayos X es la técnica que provee la información más detallada acerca de las posiciones de los átomos individuales en una proteína; sin embargo, ésta no puede utilizarse en todos los sistemas proteicos, dado que no puede ser aplicada a proteínas incapaces de cristalizar (Kong y Shaoning, 2007), como el macropolímero de gluten (MPG). Este polímero ha sido estudiado por numerosos autores (Ferrer y col., 2011; Gómez y col., 2013; Nawrocka y col., 2016; Nawrocka y col., 2017) mediante las espectroscopías vibracionales, FT-IR y Raman, las cuales son técnicas analíticas complementarias que permiten estudiar la composición química y estructura molecular de

alimentos heterogéneos y polímeros biológicos (Wellner, 2013; Bath, 2007). De hecho, presentan numerosas ventajas por las cuales han sido ampliamente utilizadas, entre ellas se destaca la preservación de la muestra, dado que no se trata de métodos destructivos, pueden ser aplicados tanto a muestras líquidas como sólidas y se requiere una pequeña cantidad de muestra (mg) para su análisis (Gómez y col., 2013; Sivam y col., 2013).

1.2.1. Estructura secundaria de las proteínas de gluten:

Banda Amida I

El espectro Raman de polipéptidos y proteínas exhibe 9 bandas características, de las cuales la de mayor importancia es la banda Amida I. La absorción Amida I se origina de los estiramientos vibracionales C=O (70-85%) del grupo amida, y proporciona una banda en la región comprendida entre 1600-1700 cm^{-1} . Este modo vibracional está directamente relacionado con la conformación de los enlaces peptídicos en la cadena principal, o *backbone* de las proteínas y no se ve influenciado por la naturaleza de las cadenas laterales. Por ello, es considerada la banda principal para el análisis de la estructura secundaria de las proteínas (Barth, 2007). Adicionalmente, la banda Amida I está formada por numerosas bandas solapadas entre sí que representan diferentes elementos estructurales, como β -sheet, α -hélice, β -turn, hélice solvatada y *random coil*. En la Tabla 3 se indican las asignaciones de frecuencia para cada tipo de conformación que componen la banda Amida I de los espectros Raman (Gómez y col., 2013). La deconvolución matemática de esta banda es utilizada para mejorar la resolución espacial de las bandas solapadas y permite estimar el contenido relativo de estructuras secundarias de este polímero.

La estructura secundaria de las proteínas de gluten está comprendida en 41% por la conformación β -sheet, 24% α -hélice, 22% β -turn y la proporción restante por estructuras extendidas (Zhang y col., 2012). Numerosos autores (Ellepola y col., 2006; Ferrer y col., 2011; Gómez y col., 2013; Nawrocka y col., 2016; Naweocka y col., 2017) han observado que el agregado de aditivos a proteínas alimentarias afecta las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas de las matrices, induciendo cambios conformacionales en las mismas. El agregado de emulsificantes a masas de trigo ocasiona el incremento en el contenido de estructuras α -hélice en detrimento de estructuras- β , y es acompañado por un aumento en el plegamiento proteico (Gómez y col., 2013). En tanto que, la adición de fibra dietaria a masas de trigo durante su amasado produce el efecto contrario, con una disminución en el contenido de α -hélices a expensas de β -sheets. Estos autores sugieren que el agregado de fibra produce una disminución en la movilidad de moléculas de agua asociadas a las proteínas de gluten por formación de puentes de hidrógeno (Nawrocka y col., 2016; Nawrocka y col., 2017).

Por otra parte, para conocer la estructura terciaria de las proteínas de gluten es importante estudiar cambios en la conformación del enlace disulfuro y en el microambiente asociado a los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano (Gómez y col., 2013).

Tabla 3. Frecuencias correspondientes a las diferentes contribuciones que constituyen la estructura secundaria de las proteínas en la banda Amida I de los espectros Raman (Gómez, 2013).

Estructura secundaria	Frecuencia (cm⁻¹)
β -sheet paralela	1609-1625
β -sheet antiparalela	1675-1695
α -hélice	1650-1658
β -turn	1666-1673
<i>Random coil</i>	1637-1645
Hélice solvatada	1625-1637

1.2.2. Estructura terciaria de las proteínas de gluten: Bandas disulfuro y aminoácidos aromáticos

Además de la caracterización de las bandas Amida, existen bandas adicionales en el espectro Raman que permiten la descripción de microambientes generados por las interacciones entre cadenas laterales de aminoácidos (Rygula y col., 2013). Entre estas bandas, son de importancia las correspondientes a estiramientos vibracionales de los enlaces disulfuro (SS) y residuos tirosina y triptófano (Gómez y col., 2013).

Los enlaces disulfuro son enlaces covalentes formados por la oxidación de grupos tiol (SH) entre dos residuos cisteína. De esta manera, se genera un entrecruzamiento entre dos cadenas polipeptídicas a través de dichos enlaces (Dombkowski y col., 2014). El

estudio de los estiramientos vibracionales en la región comprendida entre 450-545 cm^{-1} (región disulfuro) provee información acerca de los enlaces disulfuro. Existen tres modos vibracionales asociados a estos enlaces: las conformaciones gauche-gauche-gauche (g-g-g, 450-515 cm^{-1}); gauche-gauche-trans (g-g-t, 515-525 cm^{-1}) y trans-gauche-trans (t-g-t, 535-545 cm^{-1}) (Gómez y col., 2013). La conformación g-g-g es energéticamente más estable que las otras dos (Nawrocka y col., 2017) y brinda información acerca de la posibilidad de formación de puentes disulfuro intra- o intercadena en las proteínas, dependiendo donde se encuentre centrada esta banda. Frecuencias más bajas representan enlaces disulfuro de mayor longitud (intercadena); mientras que frecuencias más altas representan enlaces disulfuro de menor longitud (intracadena) (Ferrer y col., 2011).

Las vibraciones correspondientes al anillo fenoxilo de la tirosina están localizadas en 850 y 830 cm^{-1} . El cociente entre las intensidades de estas bandas ($I_{850/830}$) se incrementa a medida que lo hace el número de residuos de tirosina expuestos. La relación $I_{850/830}$ es un buen indicador de la naturaleza de los puentes de hidrógeno y del estado de ionización del hidroxilo fenólico (Gómez y col., 2013).

Por su parte, la banda correspondiente a los residuos triptófano, localizada a 760 cm^{-1} , ha sido propuesta por varios autores como un indicador de la fuerza de los puentes de hidrógeno y de la hidrofobicidad del microambiente asociado al anillo indol (Linlaud y col., 2011).

En este sentido, se propone estudiar los cambios moleculares en las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas de gluten inducidos por la actividad fermentativa de BAL y por compuestos bioactivos presentes en la miel.

2. Resultados

2.1. Cambios conformacionales en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas de gluten

Con el objetivo de evaluar el efecto que ejercen las bacterias ácido lácticas (BAL) y la miel sobre la estructura secundaria y terciaria de las proteínas de gluten, se obtuvieron muestras de gluten a partir de masas de trigo-centeno (1:1) con y sin suplementación de miel e individualmente inoculadas con las distintas cepas de BAL. Las transformaciones producidas en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas de gluten se estudiaron por espectroscopía Raman a lo largo del período de fermentación (t_0 - t_{19}).

En la Fig. 34 se presenta el espectro Raman de las proteínas de gluten obtenido a partir de una masa sin inocular (control), indicando la posición de las bandas utilizadas en su análisis.

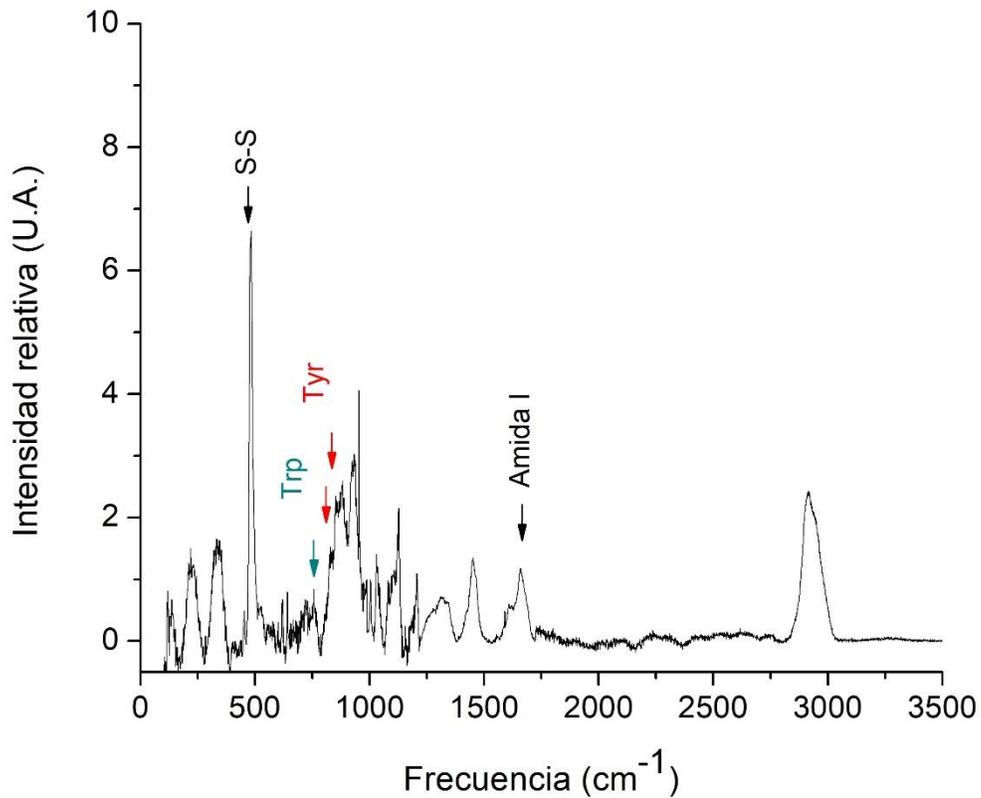


Fig. 34. Espectro Raman de proteínas de gluten obtenidas de una masa de trigo-centeno (1:1). Tyr: tirosina, Trp: triptófano, S-S: enlace disulfuro.

Dado que las proteínas son polipéptidos de gran tamaño, en su mayoría formados por cientos de aminoácidos, sus espectros vibracionales se componen de numerosas bandas solapadas. Sin embargo, la dispersión Raman de aminoácidos aromáticos y de la cadena polipeptídica principal es intensa y da lugar a una serie de picos dominantes (Koehler y Weisser, 2013).

2.1.1. Estructura secundaria de las proteínas de gluten en masas fermentadas por BAL

El efecto de las BAL sobre la estructura secundaria de las proteínas de gluten se evaluó estudiando la banda Amida I ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) en espectros Raman. Los cambios en la frecuencia de dicha banda están relacionados a cambios en la estructura secundaria de las proteínas, dado que, para cada conformación, β -sheet, α -hélice, β -turn, hélice solvatada y *random coil*, existe un intervalo de frecuencias característico (Tabla 3) (Zhang y col., 2012).

Con el objetivo de realizar una estimación cuantitativa de los diferentes elementos estructurales que conforman la estructura secundaria de las proteínas de gluten, la banda Amida I fue sometida a un proceso matemático de deconvolución. En la Fig. 35 se ejemplifica el análisis de la banda Amida I realizado en las proteínas de gluten de masas

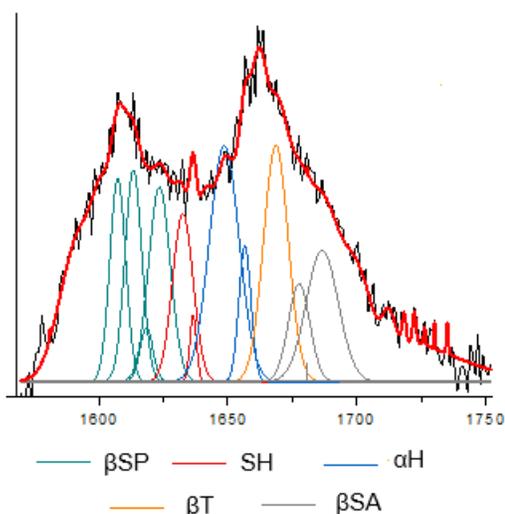


Fig. 35. Deconvolución de banda Amida I de proteínas de gluten en masas control. β SP: β -sheet paralela, SH: hélice solvatada, α H: α -hélice, β -turn, β -sheet antiparalela

control, el mismo procedimiento fue efectuado para todas las muestras estudiadas. La proporción de cada elemento de estructura secundaria se calculó como el cociente entre el área bajo la curva de cada conformación y el área total bajo la banda Amida I. A su vez, esta última se calculó como la suma de las áreas correspondientes a cada elemento de estructura secundaria.

En masas sin inocular (control) las proporciones relativas de cada conformación permanecieron aproximadamente constantes durante el período de incubación, sin registrar diferencias significativas en los distintos intervalos de tiempo (Fig. 36). La estructura β -sheet fue predominante, y representó el 45% del total de la banda Amida I; en esta conformación, los segmentos polipeptídicos establecen interacciones no covalentes mediante enlaces puente de hidrógeno de dos maneras posibles, a través de configuraciones β -antiparalela y β -paralela (Zhang y col., 2009). En masas control, del 45% de la estructura β -sheet, el 15% correspondió a la conformación β -antiparalela y el 30% a β -paralela. Por otra parte, las estructuras α -hélice, β -turn y hélice solvatada comprendieron el 26, 15 y 14%, respectivamente, del total de la banda Amida I.

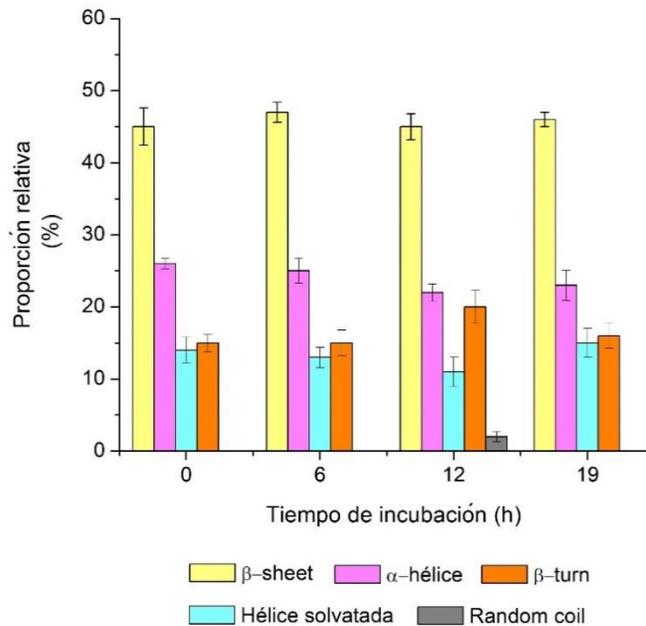


Fig. 36. Proporciones relativas (%) de elementos estructurales que constituyen la conformación secundaria de las proteínas de gluten de masas sin inocular (control) a diferentes tiempos de incubación.

Estos resultados estuvieron de acuerdo con los presentados por Zhang y col. (2012), quienes informaron que la estructura secundaria del gluten presenta una contribución de β -sheets de 41%, α -hélice 25%, β -turn 22%, y 12% corresponde a estructuras extendidas. El dominio repetitivo central de las subunidades de glutenina de elevado peso molecular (HMW-GS) es rico en β -sheets y β -turns, y adopta una conformación β -espiral característica, mientras que en las gliadinas y en los dominios terminales de las gluteninas predomina la conformación α -hélice (Nawrocka y col., 2016; Shewry y col., 2001).

En la Fig. 37 se presentan las proporciones relativas de cada conformación a la banda Amida I provenientes de los espectros Raman de masas inoculadas con *L. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* y *P. pentosaceus*.

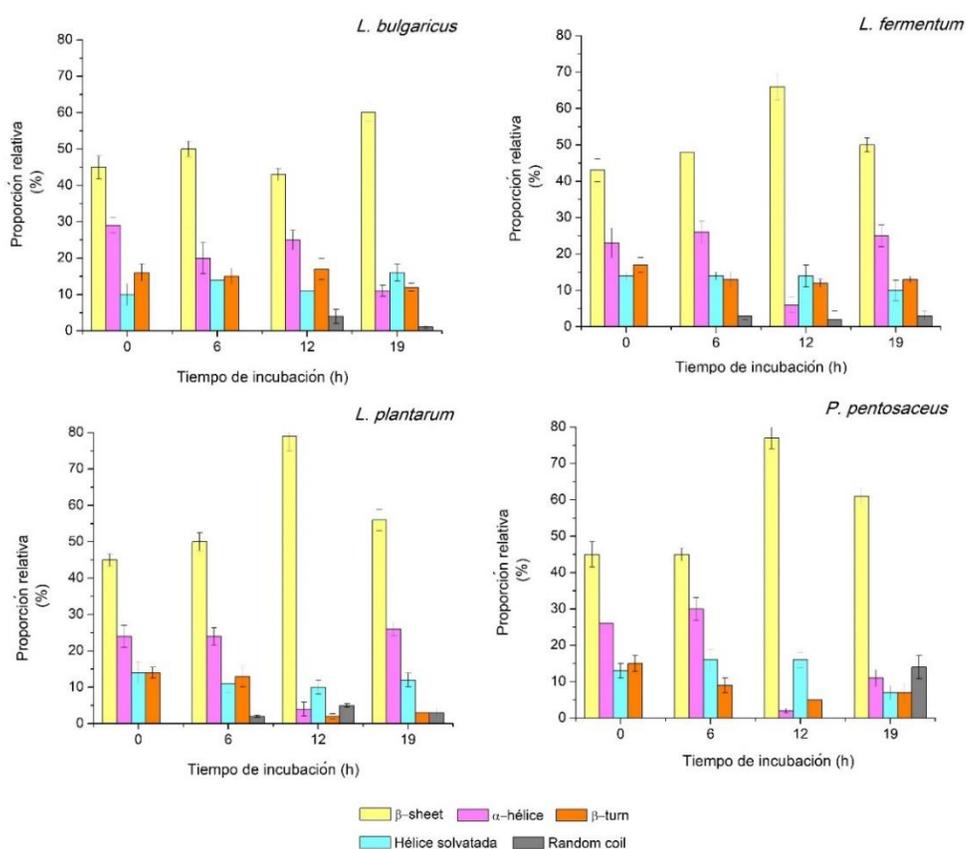


Fig. 37. Proporciones relativas (%) de elementos estructurales que constituyen la conformación secundaria de las proteínas de gluten en masas inoculadas con *L. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* y *P. pentosaceus* durante 19 h de incubación.

Durante las primeras 6 h de incubación (t_0 - t_6), las proporciones de cada conformación en todas las masas inoculadas fueron semejantes a las obtenidas en masas sin inocular (control). Es decir, no se observaron modificaciones conformacionales en las proteínas; luego de 12 h de incubación se produjeron cambios en el patrón de ordenamiento de puentes de hidrógeno, que afectaron la estructura secundaria de las proteínas.

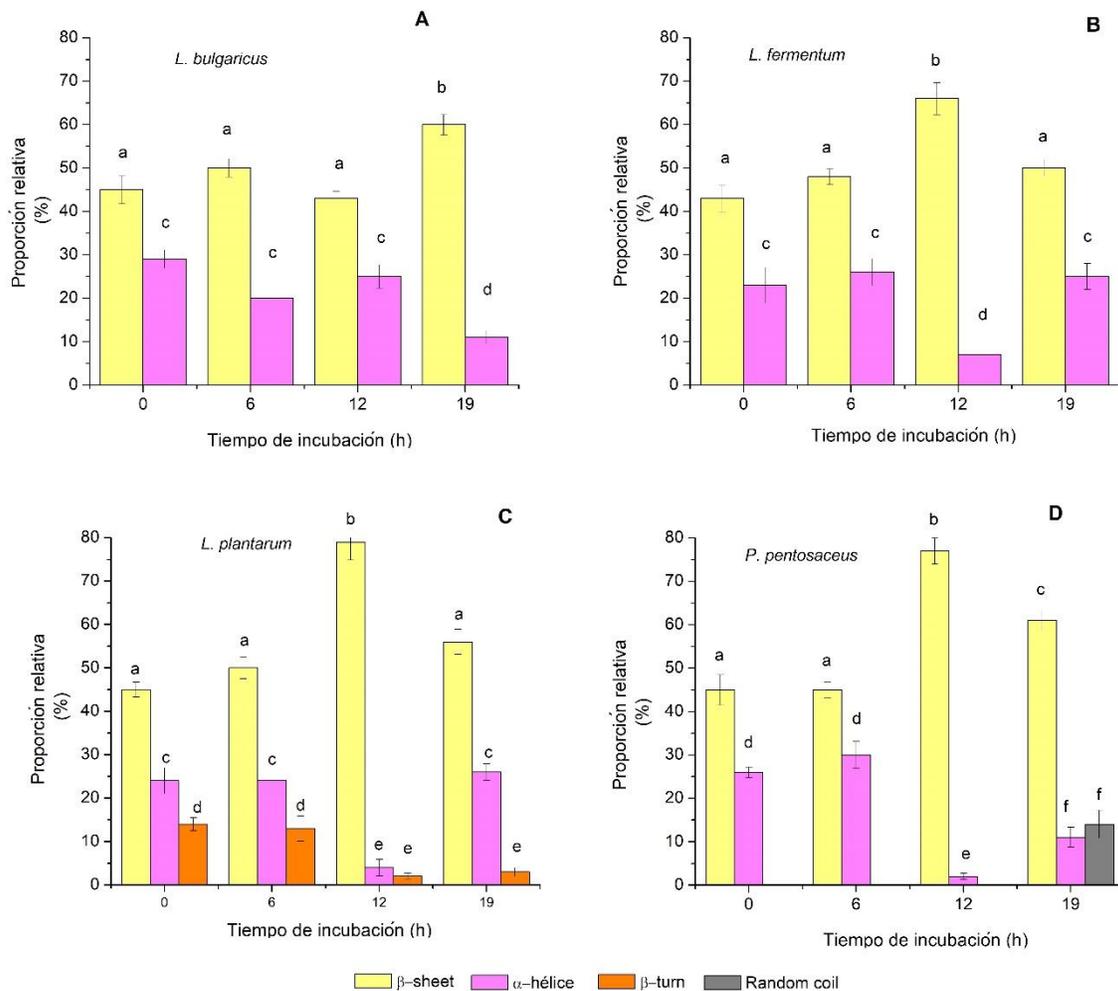


Fig. 38. Proporciones relativas (%) de las conformaciones que experimentaron modificaciones significativas durante el período de incubación en masas inoculadas con *L. bulgaricus* (A), *L. fermentum* (B), *L. plantarum* (C) y *P. pentosaceus* (D). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la Fig. 38 se presentan las conformaciones secundarias que sufrieron cambios significativos durante 19 h de fermentación en masas inoculadas con cuatro cepas de BAL. Los cambios producidos en masas inoculadas con *L. bulgaricus* fueron estadísticamente significativos luego de 19 h de fermentación; en tanto que, para *L. fermentum*, *L. plantarum* y *P. pentosaceus* ocurrieron luego de 12 h, tiempo necesario para alcanzar un pH alrededor de 4. En todos los casos, las modificaciones en la estructura secundaria de las proteínas estuvieron caracterizadas un incremento en la proporción de β -sheets, en detrimento de estructuras α -hélice (Fig. 38). Estos cambios coincidieron con el descenso de pH hasta valores comprendidos entre 4,5 y 3,7. Considerando que el pH óptimo de las proteasas endógenas se encuentra entre 3,5 y 4,0 (Gänzle y col., 2008), puede decirse que la activación de enzimas fue responsable de la hidrólisis parcial del MPG y, por lo tanto, de los cambios conformacionales observados. Esta despolimerización produce un reordenamiento en el patrón de puentes de hidrógeno de las cadenas polipeptídicas, favoreciendo a la estructura β -sheet a expensas, principalmente, de la conformación α -hélice. Adicionalmente, cuando *L. plantarum* fue utilizado como starter, el descenso en la proporción de α -hélice estuvo acompañado por la disminución en el contenido de β -turns.

Gómez y col. (2013) explicaron que un descenso en la proporción de α -hélice resulta en una estructura proteica con mayor grado de desplegamiento. Estas observaciones están de acuerdo con los cambios de microestructura, en los cuales el MPG experimentó una despolimerización, favoreciendo tanto el desarrollo de fibras como el de láminas de proteína (Figs. 18-21, **Capítulo V**). Desde otro punto de vista, la disminución en el contenido de β -sheets contribuye a la reducción de la alergenicidad del gluten. Esta conformación, junto a una secuencia específica de aminoácidos presentes en gliadinas y los enlaces disulfuro, son considerados factores alérgenos del gluten (Nawrocka y col., 2016). De esta manera, la actividad de *L. plantarum* contribuiría a reducir la alergenicidad de las proteínas de gluten.

A 19 h de incubación, se incrementó la proporción relativa de estructuras α -hélice cuando las masas fueron fermentadas por *L. fermentum*, *L. plantarum* y *P. pentosaceus*. Se sugiere que, en este punto, la despolimerización del gluten fue suficiente para alejar a las subunidades de glutenina y reemplazar los puentes de hidrógeno intercadena por intracadena, los cuales estabilizan estructuras secundarias de tipo α -hélice.

Las proteínas de gluten de masas inoculadas con *P. pentosaceus*, experimentaron cambios en el patrón de ordenamiento de puentes de hidrógeno que favorecieron la conformación *random coil*. En consecuencia, se produjo la pérdida de estructuras secundarias verdaderas, dado que esta conformación es considerada una distribución aleatoria de conformaciones (Nawrocka y col. 2016).

En la Fig. 39 se presenta la contribución de conformaciones β -antiparalela y β -paralela a la estructura β -sheet de las proteínas de gluten, en masas fermentadas por las cuatro cepas de BAL.

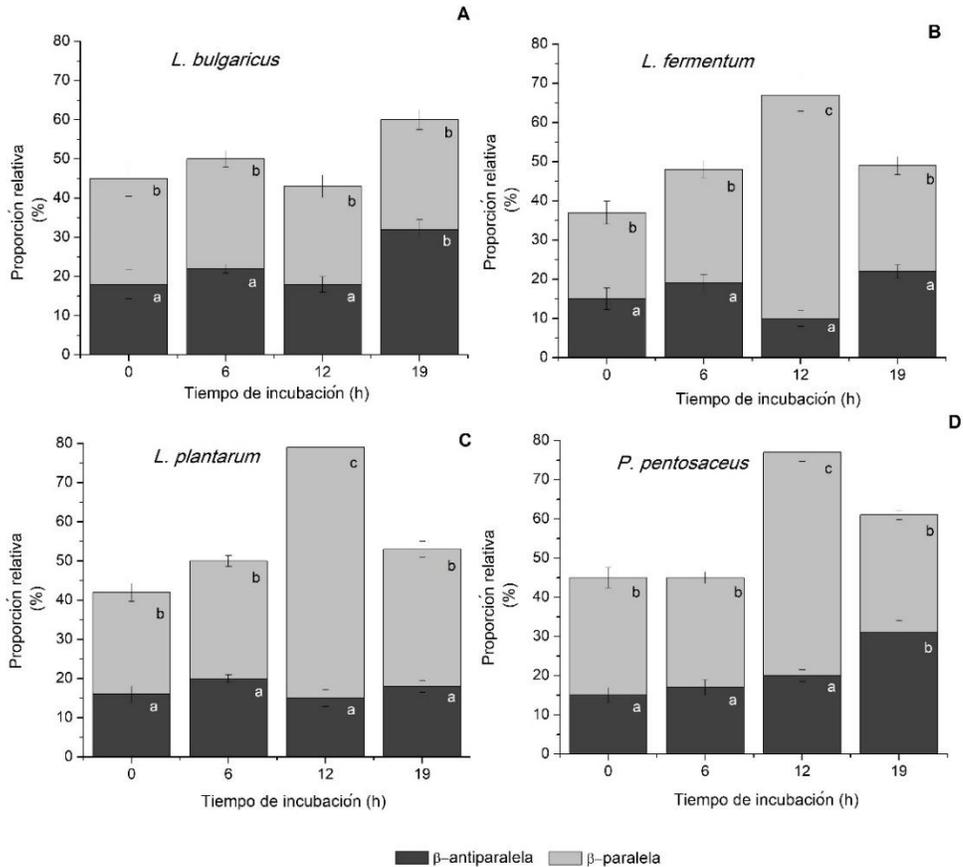


Fig. 39. Proporciones relativas (%) de β -sheets antiparalelas y paralelas de proteínas de gluten en masas inoculadas con *L. bulgaricus* (A), *L. fermentum* (B), *L. plantarum* (C) y *P. pentosaceus* (D) durante 19 h de incubación. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando *L. bulgaricus* fue utilizado como starter, la conformación β -antiparalela fue responsable exclusiva del incremento total de β -sheets, duplicando la proporción inicial (Fig. 39 A). Esta conformación es más estable que la forma β -paralela debido al arreglo lineal de puentes de hidrógeno que se establece entre cadenas polipeptídicas (Fig. 40 B) (Zhang y col., 2009).

Para el resto de las masas, y en contraposición a los resultados obtenidos para *L. bulgaricus*, la conformación β -paralela fue responsable exclusiva de los cambios observados en el porcentaje de β -sheets (Fig. 39 B-D). Esta conformación está caracterizada por establecer puentes de hidrógeno no lineales entre cadenas polipeptídicas (Fig. 40 A), confiriendo cierto grado de asimetría a la estructura β -sheet (Zhang y col., 2012). Por otro lado, al finalizar el período de

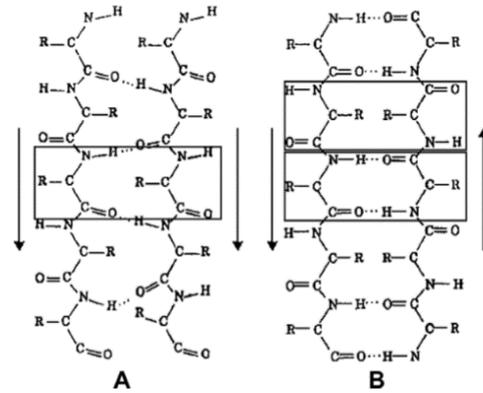


Fig. 40. Diagrama representando a las configuraciones (A) paralela y (B) antiparalela de la estructura β -sheet. El recuadro muestra tres apareamientos inter-hebra (Zhang y col., 2009).

incubación (t_{19}), se observó un incremento significativo en la proporción de β -sheets antiparalelas en masas fermentadas por *P. pentosaceus* (Fig. 39 D). Al igual que para *L. bulgaricus*, esta conformación duplicó los valores iniciales. El predominio de la conformación β -sheet antiparalela coincidió con el desarrollo de una microestructura caracterizada por una red regular de fibras proteicas (Fig. 41), sugiriendo una correlación entre esta conformación secundaria y la microestructura de tipo fibra.

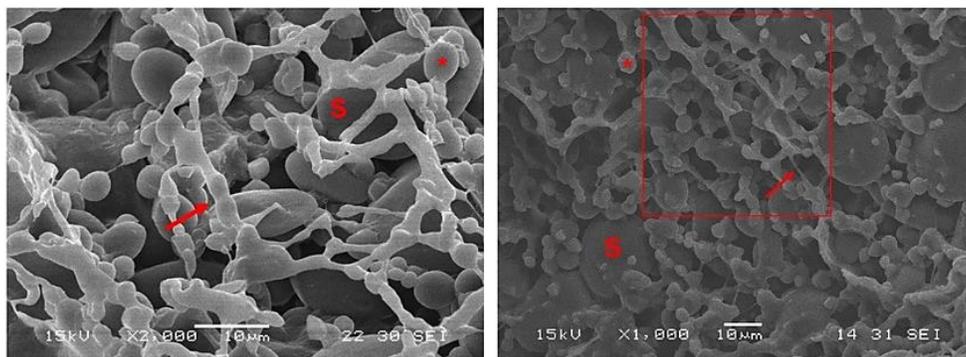


Fig. 41. Micrografía SEM de masas inoculadas con (A) *L. bulgaricus* y (B) *P. pentosaceus* a 19 h de fermentación. S: gránulo de almidón de ~ 20 μ m; Asterisco (*): gránulo de almidón de ~ 5 μ m; Flechas: fibras de gluten. Recuadro: red de fibras.

2.1.2. Estructura secundaria de las proteínas de gluten en masas fermentadas por BAL y suplementadas con miel

La incorporación de miel modificó la estructura secundaria de las proteínas de gluten, alterando el patrón regular de puentes de hidrógeno que caracteriza a estructuras α -hélice. En estas masas, y con respecto a masas sin miel agregada, la proporción de α -hélice se redujo a la mitad (13%), mientras que la conformación *random coil*, no detectada en masas control, contribuyó en 23% a la banda Amida I (Fig. 42). Como ha sido mencionado, *random coil* no es considerada un tipo de conformación verdadera, de manera que la incorporación de miel a las masas condujo a la pérdida de estructuras secundarias en las proteínas. Numerosos autores (Brock y Damodaran, 2013; Nawrocka y col., 2016) han informado que la suplementación de masas con aditivos naturales induce modificaciones en la estructura secundaria de las proteínas de gluten. La inclusión de salvado en la composición de masas produce un incremento en la proporción de *random coils* (Brock y Damodaran, 2013); en tanto que, la adición de fibra dietaria disminuye el porcentaje de α -hélice (Nawrocka y col., 2016). Tanto los polisacáridos complejos presentes en la fibra, como los monosacáridos provenientes de la miel produjeron un efecto similar sobre las proteínas de gluten, sugiriendo que los grupos hidroxilo (OH) interfieren con las uniones por puente de hidrógeno y, por lo tanto, con la estructura secundaria de estas proteínas.

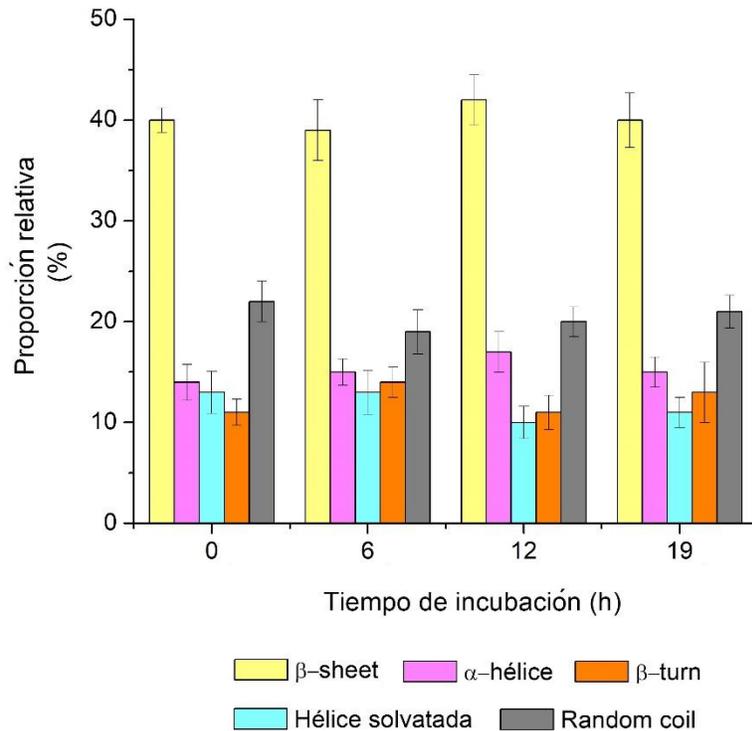


Fig. 42. Proporciones relativas (%) de elementos estructurales que constituyen la conformación secundaria de las proteínas de gluten en masas suplementadas con miel a diferentes tiempos de incubación.

Por otra parte, al inicio del período fermentativo (t_0) las proteínas de gluten en masas suplementadas con miel e inoculadas con BAL presentaron proporciones relativas de conformaciones secundarias semejantes a las observadas en masas con miel sin microorganismos agregados. Las proporciones de cada conformación estuvieron alrededor de 40% para la estructura β -sheet (30% β -paralela y 10% β -antiparalela), 14% α -hélice, 14% β -turn, 13% hélice solvatada y 19% *random coil*.

A partir de 6 h de fermentación, en todas las masas se observaron cambios en la contribución de cada conformación a la banda Amida I.

2.1.2.1. *L. bulgaricus*

Los cambios conformacionales en las proteínas de gluten de masas suplementadas con miel y fermentadas por *L. bulgaricus* ocurrieron en las primeras 6 h de incubación (Fig. 43 A). Estos resultados coincidieron con el descenso de pH observado para esta cepa como consecuencia de la suplementación con miel (**Capítulo IV**). La proporción de β -sheets se incrementó significativamente (54%) en detrimento de estructuras con menor grado de ordenamiento o *random coil*. De esta manera, la actividad de *L. bulgaricus* favoreció la formación de verdaderas estructuras secundarias, que se habían perdido con el agregado de miel. Asimismo, la conformación β -paralela fue responsable exclusiva del incremento en β -sheets, duplicando el valor inicial (Fig. 43 B). Con el transcurso de la incubación (t_{19}), la proporción de β -sheets paralela se elevó a 78%, a expensas de estructuras α -hélice y β -turn. Estos resultados se diferenciaron radicalmente de los obtenidos en masas fermentadas sin miel, los cuales se caracterizaron por un incremento significativo de la conformación β -antiparalela. Los cambios conformacionales estuvieron acompañados de microestructuras bien diferenciadas. En masas inoculadas y sin miel, prevaleció una red regular de fibras de gluten; mientras que, la presencia de miel promovió la formación de una película o lámina extendida (Figs. 18 y 23, **Capítulo V**). De los resultados expuestos puede inferirse que las configuraciones β -antiparalela y β -paralela juegan un rol fundamental en la microestructura.

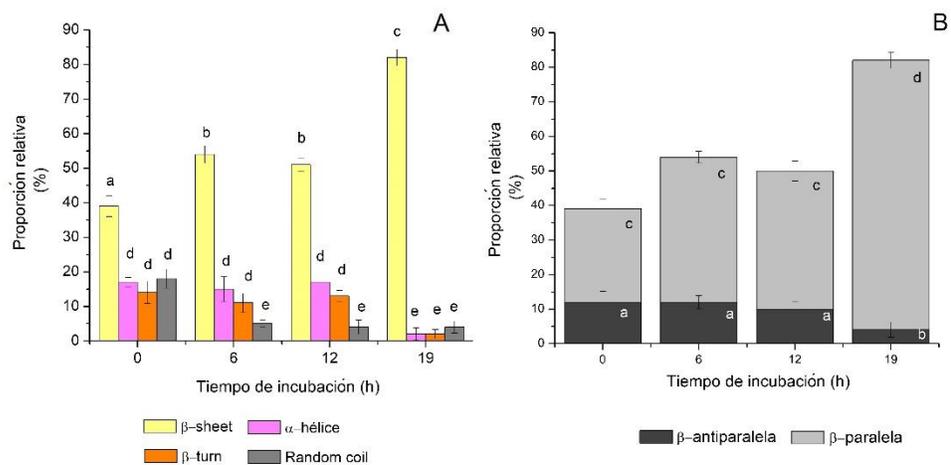


Fig. 43. Masas suplementadas con miel e inoculadas con *L. bulgaricus* durante 19 h de incubación. Proporciones relativas (%) de las conformaciones presentes en las proteínas de gluten que exhibieron cambios significativos (A) β -sheet, α -hélice, β -turn y *random coil*; (B) β -sheet antiparalelas y paralelas.. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.1.2.2. *L. fermentum*

Durante las primeras 6 h de incubación, la proporción de β -sheets se incrementó significativamente, al tiempo que disminuyó la proporción de *random coils* (Fig. 44 A). La contribución de la conformación β -antiparalela pasó de 12 a 28%.

Este incremento, al igual que en masas suplementadas con miel y fermentadas por *L. bulgaricus*, se correspondió con una microestructura donde predominó el desarrollo de fibras de gluten (Fig. 24, **Capítulo V**). Con el transcurso del período de incubación (t_{19}), la proporción de β -sheets se vio nuevamente incrementada, siendo la forma β -paralela la que contribuyó principalmente a la conformación β -sheet (Fig. 44 B).

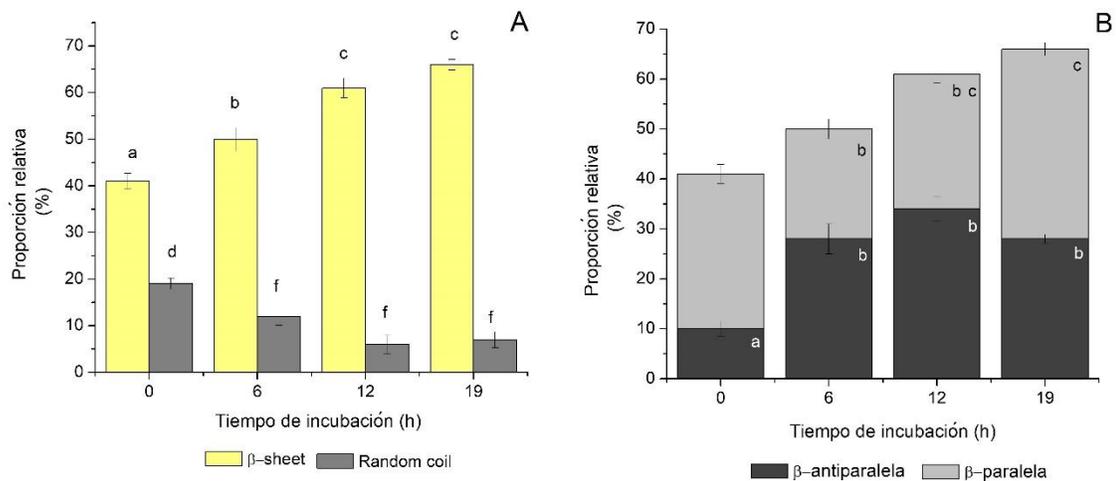


Fig. 44. Masas suplementadas con miel e inoculadas con *L. fermentum* durante 19 h de incubación. Proporciones relativas (%) de las conformaciones presentes en las proteínas de gluten que exhibieron cambios significativos (A) β -sheet y *random coil*; (B) β -sheets antiparalelas y paralelas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.1.2.3. *L. plantarum*

En la Fig. 45 se presenta la contribución de cada conformación a la estructura secundaria de las proteínas de gluten de masas fermentadas por *L. plantarum*.

Al igual que en masas sin miel, los cambios conformacionales ocurrieron a las 12 h de fermentación, obteniéndose un incremento *significativo en la proporción de estructuras β -sheets paralelas, mientras, se redujo el porcentaje de random coils y estructuras α -hélice.* El perfil fermentativo exhibido por esta cepa no se vio modificado por la presencia de miel. Asimismo, la microestructura de gluten no mostró cambios apreciables y estuvo caracterizada por el desarrollo de una película de proteína.

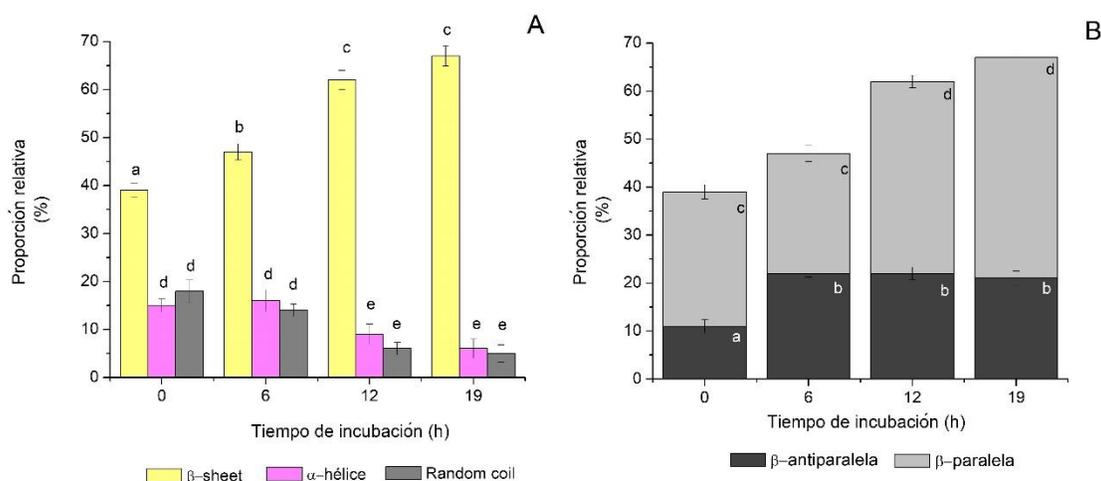


Fig. 45. Masas suplementadas con miel e inoculadas con *L. plantarum* durante 19 h de incubación. Proporciones relativas (%) de las conformaciones presentes en las proteínas de gluten que exhibieron cambios significativos (A) β -sheet, α -hélice y *random coil*; (B) β -sheets antiparalelas y paralelas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.1.2.4. *P. pentosaceus*

En la Fig. 46 se presenta la contribución de cada conformación a la estructura secundaria de las proteínas de gluten en masas fermentadas por *P. pentosaceus*. Al igual que para el resto de las cepas estudiadas, durante las primeras 6 h de incubación se incrementó la proporción de β -sheets, en detrimento de *random coils*. Sin embargo, a diferencia del resto de las BAL, transcurridas 12 h de fermentación, aumentó el contenido de α -hélices a expensas de β -sheets.

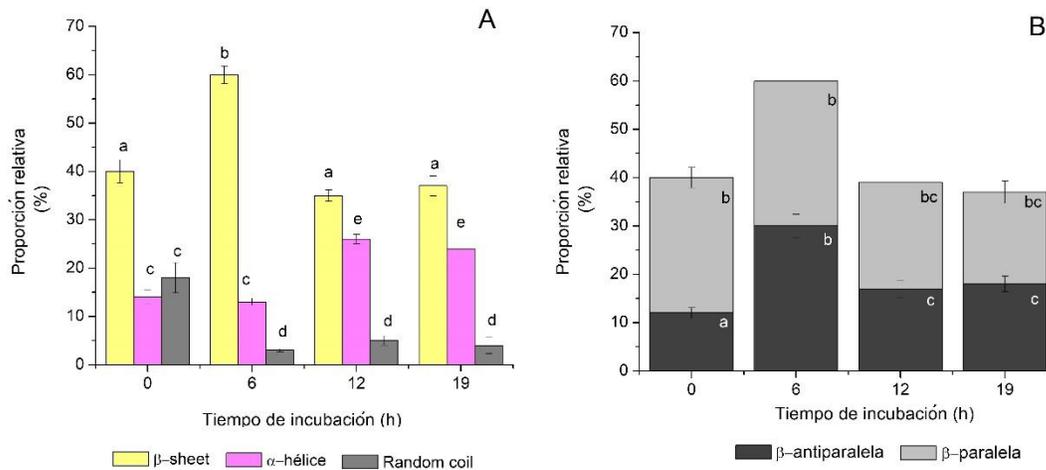


Fig. 46. Masas suplementadas con miel e inoculadas con *P. pentosaceus* durante 19 h de incubación. Proporciones relativas (%) de las conformaciones presentes en las proteínas de gluten que exhibieron cambios significativos (A) β -sheet, α -hélice y *random coil*; (B) β -sheets antiparalelas y paralelas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La inoculación con BAL a masas suplementadas con miel no modificó las conformaciones de proteína durante las primeras horas de incubación. La actividad fermentativa es escasa durante la fase de latencia de los microorganismos, que deben adaptarse a este nuevo ambiente. Entre 6 y 12 h de fermentación, el metabolismo de

hidratos de carbono simples, provenientes de harinas y miel, promovió el crecimiento activo y la producción de ácidos orgánicos. Conforme se incrementó la acidez del sistema, las enzimas provenientes de las harinas fueron activadas; en tanto que, la actividad de GOX sería prácticamente inhibida por alejarse de su valor óptimo de pH.

Las cadenas polipeptídicas de menor tamaño, originadas a partir de la actividad de BAL, interaccionan a través de puentes de hidrógeno y favorecen, así, la conformación β -sheet. Contrariamente, las proteínas de masas fermentadas por *P. pentosaceus* mostraron un predominio de α -hélice, probablemente relacionado a la actividad pseudocatalasa, o catalasa no-hemo, que posee esta especie, cuya actividad óptima se encuentra alrededor de pH 5. La actividad de esta enzima se encuentra implicada en la eliminación del H_2O_2 formado por GOX presente en la miel. La destrucción de este compuesto evita la formación de enlaces disulfuro, considerados los principales enlaces covalentes que mantienen unidas las subunidades de glutenina. De esta manera, es posible inferir que se dificultan las interacciones intercadena vía puente de hidrógeno, mientras que se ven favorecidas las uniones intracadena, responsables de la estabilización de la conformación α -hélice.

En resumen, la actividad de BAL modificó la estructura secundaria de las proteínas de gluten, exhibiéndose en todas las muestras un incremento en la proporción de estructuras β -sheets, a expensas de la conformación α -hélice. Estas modificaciones están vinculadas a una mayor movilidad de las cadenas polipeptídicas debido a la interacción con moléculas de agua y a la propensión que presentan algunos de los aminoácidos mayoritarios del gluten, prolina y glicina, a formar parte de estructuras β -sheets (Bhattacharjee y Biswas, 2010). El aumento en la concentración de protones durante la fermentación promueve la repulsión entre cadenas polipeptídicas, favorece la entrada de moléculas de agua y, por lo tanto, la interacción con residuos de aminoácidos. Estos

cambios se correlacionaron, a nivel microestructural, con el desarrollo de fibras y láminas de proteína.

Por otra parte, el agregado de miel a las masas favoreció la pérdida de estructuras secundarias al incrementarse la proporción relativa de *random coils* a expensas de la conformación α -hélice. En numerosos estudios (Brock y Damodaran, 2013; Gómez y col., 2013; Nawrocka y col., 2016) se han empleado aditivos, químicos o naturales, para modificar la estructura secundaria de las proteínas de gluten, logrando diferentes efectos, como la modificación de las propiedades funcionales de las masas, y la reducción de la alergenicidad del gluten, entre otros. Asimismo, la actividad fermentativa de las BAL recuperó la formación de las estructuras secundarias que se habían perdido con el agregado de miel.

2.1.3. Estructura terciaria de las proteínas de gluten

2.1.3.1. Banda disulfuro

2.1.3.1.1. Banda disulfuro. Efecto de BAL

Los enlaces disulfuro juegan un rol primordial en la determinación de la estructura y propiedades funcionales de las proteínas de gluten (Koehler y Weisser, 2013). Por este motivo, su estudio resulta fundamental en el monitoreo de los cambios estructurales de estas proteínas. El estudio de la banda situada a 450-545 cm^{-1} en el espectro Raman provee información acerca de las vibraciones de estiramiento correspondiente al enlace disulfuro; los mismos pueden presentarse en tres modos vibracionales: *gauche-gauche-gauche* (g-g-g, 450-515 cm^{-1}), *gauche-gauche-trans* (g-g-t, 515-525 cm^{-1}) y *trans-gauche-*

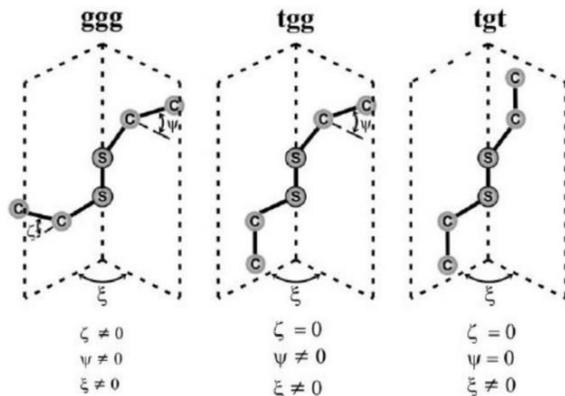


Fig. 47. Representación esquemática de las tres conformaciones estables que pueden adoptar los enlaces disulfuro (Brandt y col. 2014).

trans (t-g-t, $535\text{-}545\text{ cm}^{-1}$) (Gómez y col., 2013) (Fig. 47). Las muestras de gluten obtenidas en masas sin inocular ($t_0\text{-}t_{19}$) presentaron bandas disulfuro localizadas a 480 cm^{-1} , cuya intensidad no exhibió variaciones significativas durante el período de incubación, promediando el valor de 6,59 U.A. De esta manera, la conformación asignada para este enlace covalente correspondió al rotámero g-g-g. Las

conformaciones asociadas a esta banda son consideradas más estables y están relacionadas a dos tipos de configuraciones: intercadena e intracadena (Gómez y col., 2013). Las primeras, están vinculadas a valores de frecuencias más bajos ($450\text{-}500\text{ cm}^{-1}$), correspondiendo a enlaces disulfuro de mayor longitud o intercadena; mientras que las segundas están asociadas a valores de frecuencias más altos ($500\text{-}515\text{ cm}^{-1}$) correspondiéndose con enlaces más cortos, de tipo intracadena (Ferrer y col., 2011; Gómez y col., 2013). La mayor parte de los residuos cisteína de las gluteninas están involucrados en enlaces disulfuro intercadena, permitiendo la polimerización de esta fracción proteica; en tanto que, en las gliadinas predominan los enlaces disulfuro intracadena, confiriendo estabilidad estérica al macropolímero (Koehler y Weisser, 2013).

En masas inoculadas con BAL, la banda disulfuro de gluten también se centró a 480 cm^{-1} y no experimentó modificaciones en su intensidad en el transcurso de las primeras 12 h de fermentación, encontrándose alrededor de 6,5 U.A., sin diferencias significativas respecto a la masa control. En la Fig. 48 se presentan los espectros Raman centrados en la banda disulfuro (480 cm^{-1}) y las respectivas intensidades de banda para cada muestra inoculada luego de 19 h de fermentación.

Al finalizar el período de incubación, *L. bulgaricus* exhibió la mayor intensidad de banda, duplicando los valores iniciales. En tanto que, *L. fermentum* presentó una disminución en la intensidad de 30%; mientras que, para *L. plantarum* y *P. pentosaceus* la disminución fue de 15%.

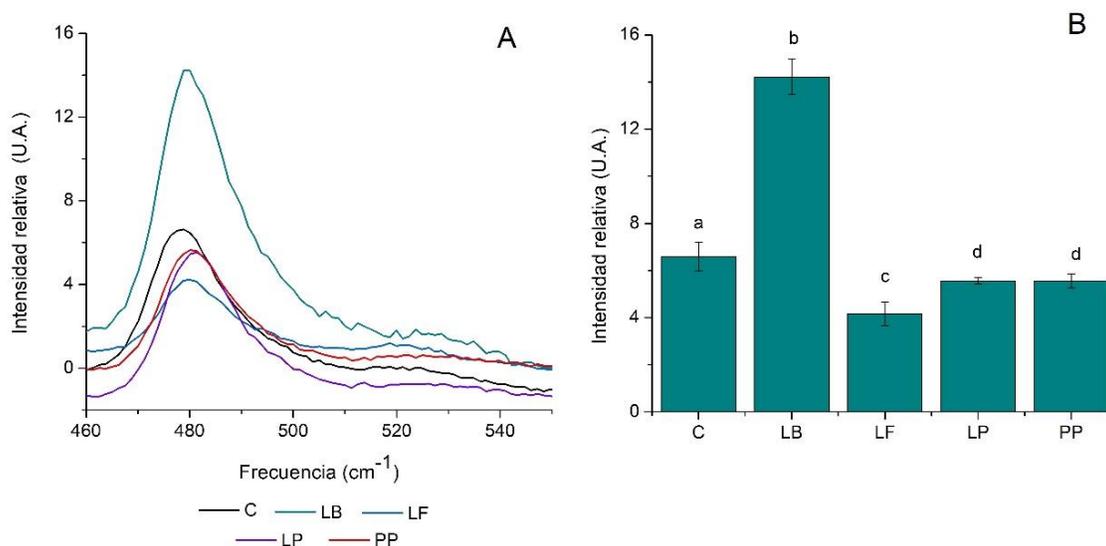


Fig. 48. (A) Espectros Raman centrados en 480 cm⁻¹ (banda disulfuro) e (B) Intensidad de banda disulfuro de masas sin inocular (C) e inoculadas con *L. bulgaricus* (LB), *L. fermentum* (LF), *L. plantarum* (LP) y *P. pentosaceus* (PP) a 19 de incubación.

En el caso de *L. bulgaricus*, estos resultados demuestran la formación de nuevos enlaces disulfuro. En contraposición, una disminución en la intensidad de banda evidencia ruptura de enlaces disulfuro, generando subunidades de proteína de menor tamaño. La marcada disminución en la intensidad de banda observada para *L. fermentum* indicó la despolimerización del macropolímero y coincidió con la disgregación de las proteínas de gluten observada en la Fig. 49.

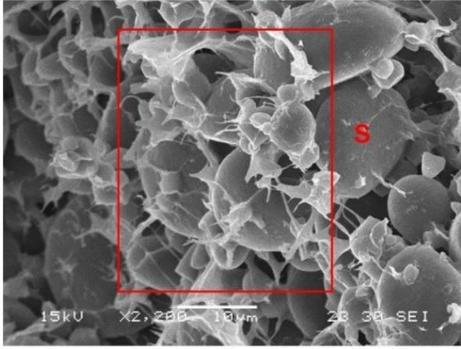


Fig. 49. Micrografía electrónica de barrido de masa inoculada con *L. fermentum* a 19 h de fermentación. S: gránulo de almidón. Recuadro: gluten disgregado.

Como ya se ha mencionado, los enlaces disulfuro juegan un rol fundamental en la estabilización de la estructura secundaria y, por lo tanto, en la formación de microestructuras. Asimismo, se les ha atribuido efectos nutricionales adversos, ya que constituyen uno de los componentes del gluten responsable de su alergenicidad (Nawrocka y col., 2016). Se ha estimado que alrededor del 1% de la población occidental exhibe algún tipo de reacción alérgica a

las proteínas de gluten (Biesiekierski e Iven, 2015). Nawrocka y col. (2016) describieron que tal respuesta inmunológica puede ser minimizada luego de tratar las masas con agentes reductores. En base a los resultados obtenidos, tres de las cepas estudiadas, *L. fermentum*, *L. plantarum* y *P. pentosaceus*, han demostrado su capacidad para reducir el contenido de enlaces disulfuro en las proteínas de gluten. Sin embargo, la presencia de estos enlaces es necesaria, dado que imparten estabilidad estructural, manteniendo la integridad de la red de gluten (Shewry y col., 2001). De esta manera, resulta fundamental que el tratamiento con BAL no afecte negativamente las propiedades funcionales que caracterizan al gluten y que permiten la obtención de productos de calidad panadera. Los resultados de intensidad de banda disulfuro y microestructura de gluten realizados en este trabajo han demostrado que, *L. plantarum* y *P. pentosaceus* fueron capaces de disminuir el contenido de enlaces disulfuro sin comprometer la microestructura de las proteínas.

2.1.3.1.2. Banda disulfuro. Efecto de miel

La suplementación de estos sistemas con miel aumentó gradualmente la intensidad de banda disulfuro (I_{480}) de las proteínas de gluten (Fig. 50). Al finalizar el período de incubación (t_{19}) la intensidad de banda duplicó su valor inicial. Asimismo, se observó una banda adicional centrada en 525 cm^{-1} , correspondiente a la conformación t-g-t.

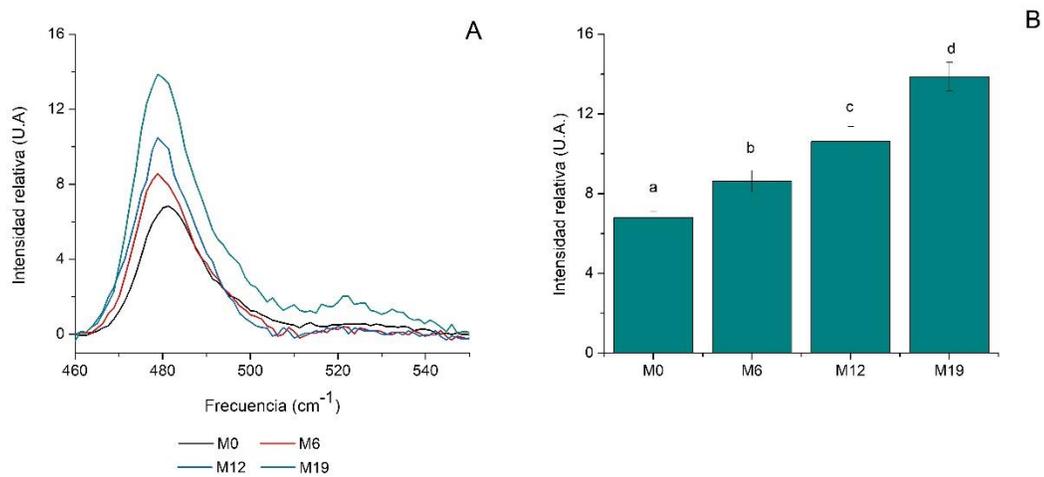


Fig. 50. (A) Espectros Raman centrados en 480 cm^{-1} (banda disulfuro) e (B) Intensidad de banda disulfuro de masas con miel e inoculadas a 0 (M0), 6 (M6), 12 (M12) y 19 h (M19) de incubación.

Debemos puntualizar que el aumento en la proporción de enlaces disulfuro corresponde al aumento de entrecruzamientos efectivos entre

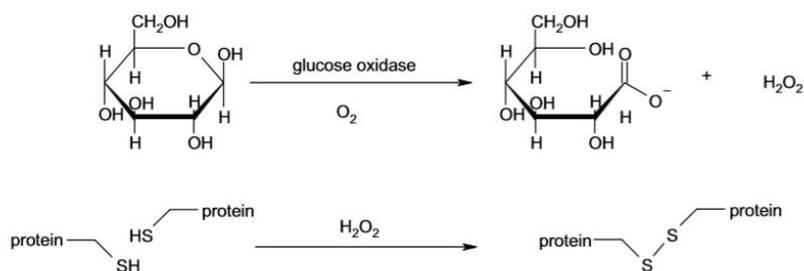


Fig. 51. Mecanismo de acción de GOX en la formación de enlaces disulfuro.

subunidades de glutenina. Esto se asocia con la actividad de la enzima GOX, presente naturalmente en las mieles, cuya actividad ha sido comprobada en todas las muestras estudiadas (**Capítulo IV, 2.1.**). Como ha sido mencionado, esta enzima cataliza la oxidación de la glucosa, en presencia de oxígeno, para formar δ -gluconolactona y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este último ha sido hipotetizado por Di Cagno y col. (2003) como responsable del desarrollo de una red de gluten óptima, dado que

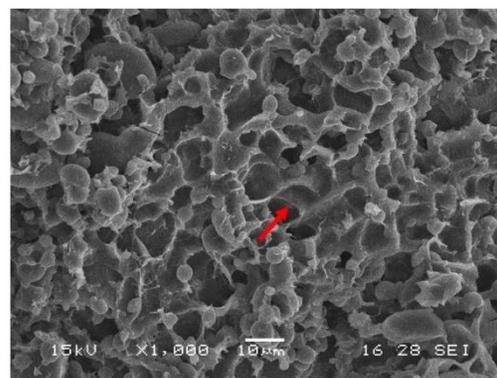


Fig. 52. Micrografía electrónica de barrido de masa suplementada con miel de *Prosopis spp.* La flecha roja muestra la red densa de proteína.

su presencia en la matriz de una masa modifica el potencial redox de la misma. Nuestros resultados apoyaron las sugerencias de numerosos autores (Csonka, 1989; Hosoney y col., 1969; Rasiah y col., 2005; Vermulapalli y col., 1998) con respecto al rol que cumplen los puentes disulfuro en la red de gluten y su importancia con relación al mejoramiento de las propiedades funcionales de masas y productos panificados. El tratamiento con GOX disminuye el número de grupos sulfhidrilo libres, intensificando las interacciones proteína-proteína mediante la formación de enlaces covalentes disulfuro (Fig. 51). De esta manera, el agregado de miel promovió la formación de entrecruzamientos intercadena, y contribuyó

con la polimerización del MPG. Estos resultados coincidieron con las observaciones microscópicas que mostraron una red hiperconectada de proteína (Fig. 52).

2.1.3.1.3. Banda disulfuro. Efecto de BAL en masas suplementadas con miel.

En todas las masas inoculadas con BAL y suplementadas con miel no se registraron modificaciones significativas en la intensidad de banda disulfuro (I_{480}) durante las primeras 6 h de incubación, 6,7 U.A, en promedio. Transcurridas 12 h de fermentación, la intensidad se incrementó significativamente en las masas inoculadas con *L. bulgaricus*, *L. fermentum* y *L. plantarum*, y este valor se mantuvo constante hasta finalizar el período de incubación (8,7 U.A.) (Fig. 53). Estos valores fueron significativamente superiores a los observados en masas inoculadas y sin miel agregada (Fig. 48). Como ha sido mencionado, opuestamente al efecto hidrolítico de las BAL, la GOX promueve la formación de enlaces disulfuro. Aún así, entre 12 y 19 h de fermentación, la intensidad de banda disulfuro no alcanzó el valor observado en masas con miel sin fermentar (I_{480} :13,87). Por otro lado, el agregado de miel en masas fermentadas con *P. pentosaceus* no modificó significativamente la intensidad de banda respecto a masas solo fermentadas (I_{480} : 5,65). Esta cepa es potencialmente capaz de eliminar el H_2O_2 producido por la GOX, impidiendo la oxidación de los sulfhidrilo libres. Si bien las BAL son catalasa negativa, *P. pentosaceus* posee una elevada actividad

catalasa no-hemo, como mecanismo de eliminación efectivo de H₂O₂ (Englesser y col., 1994).

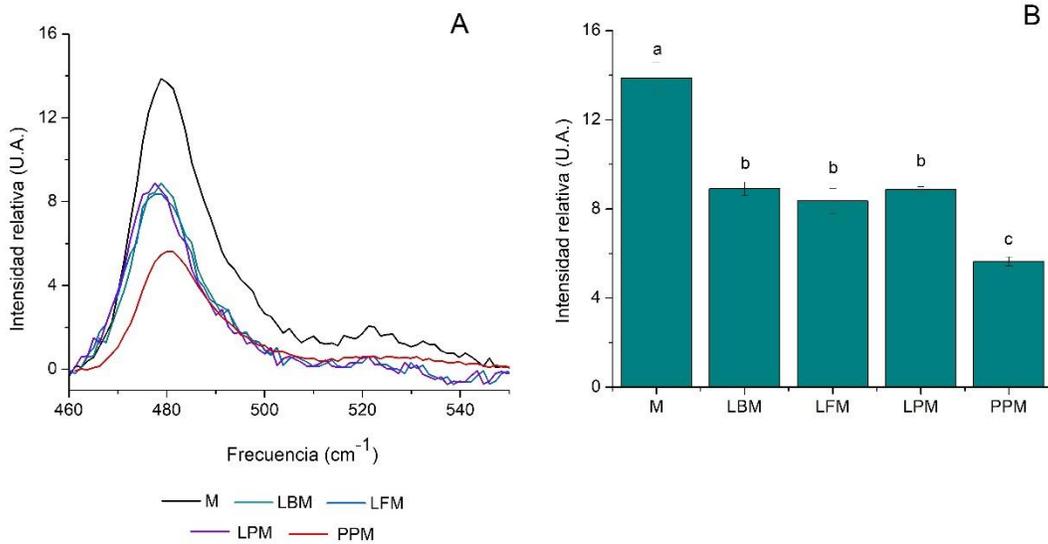


Fig. 53. (A) Espectros Raman centrados en 480 cm⁻¹ (banda disulfuro) e (B) intensidad de banda disulfuro de masas con miel e inoculadas con *L. bulgaricus* (LB), *L. fermentum* (LF), *L. plantarum* (LP) y *P. pentosaceus* (PP) a 19 h de incubación.

La disminución de la intensidad de banda disulfuro respecto a la masa con miel sin microorganismos agregados para *L. bulgaricus*, *L. fermentum* y *L. plantarum*, está directamente relacionada con la actividad pH dependiente de las enzimas presentes en el sistema (Fig. 54). Por un lado, las enzimas endógenas del trigo, con un óptimo de actividad entre 3,5 y 4,0, son responsables de la despolimerización del MPG. Por otra parte, la GOX posee un pH óptimo de 6,0 y es

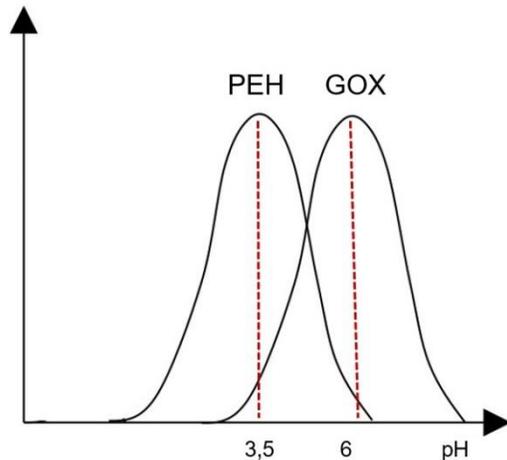


Fig. 54. Actividad enzimática en función del pH para proteasas endógenas de harinas (PEH) y glucosa oxidasa (GOX).

responsable de promover el entrecruzamiento entre subunidades de proteína. Entre 6 y 12 h de incubación, cuando todavía el pH se mantiene en un rango entre 6,0 y 4,8 (Fig. 13, **Capítulo IV**) prevalece el efecto de la GOX, promoviendo la formación de nuevos enlaces disulfuro entre cadenas polipeptídicas. Sin embargo, con la actividad fermentativa, los valores de pH descendieron lo suficiente como para activar las proteasas endógenas del trigo; en tanto que, la actividad GOX fue mínima. Como resultado, el MPG es escindido en distintos puntos, contrarrestando el plegamiento proteico que induce la miel.

2.1.3.2. Banda triptófano y doblete de tirosina

El estudio de las bandas Raman correspondientes a los aminoácidos aromáticos triptófano (Trp, 760 cm^{-1}) y tirosina (Tyr, 850 y 830 cm^{-1}) contribuye a un mejor entendimiento de la estructura terciaria de las proteínas de gluten. La banda correspondiente a triptófano provee información acerca de la hidrofobicidad de la proteína; en tanto, el cociente entre las intensidades de bandas tirosina ($I_{850/830}$), doblete tirosina, está asociado con el grado de exposición de los residuos tirosina y es un buen indicador de la naturaleza de los enlaces puente de hidrógeno y del estado de ionización de grupos hidroxilo fenólicos presentes en la molécula (Gómez y col., 2013; Nawrocka y col., 2017). Las intensidades de banda correspondientes a los aminoácidos triptófano y tirosina de las proteínas de todas las muestras estudiadas se presentan en la Tabla 4. En masas sin inocular (control), la intensidad de banda triptófano fue de 0,14 U.A. El resto de las masas estudiadas exhibió un incremento de intensidad, indicando una menor exposición de residuos triptófano respecto del gluten nativo. Según Nawrocka y col. (2017), este comportamiento se adjudica al repliegue de los residuos triptófano en un ambiente hidrofóbico. La menor exposición de residuos triptófano en masas fermentadas por BAL estaría asociada con el ambiente hidrofílico debido a la producción de ácidos orgánicos.

Esto explica la mayor intensidad de banda presentada por *L. plantarum*, 0,78 U.A., cepa que, justamente, presentó los mayores valores de TTA (16,3 ml NaOH 0,1 M). Para el resto de las masas, los valores promediaron 0,45 U.A.

Por otra parte, la intensidad del doblete de tirosina ($I_{850/830}$) de las proteínas de masas control promedió 1,56 U.A. Los resultados obtenidos en el presente trabajo estuvieron de acuerdo con aquellos presentados por Nawrocka y col. (2017), quienes obtuvieron una $I_{850/830}$ de 1,55 U.A. para el gluten nativo. Todas las masas estudiadas, exhibieron un incremento en la intensidad del doblete tirosina, lo cual es consistente con un desplegamiento de la proteína (Nawrocka y col., 2017). Estos resultados guardan relación con la hidrólisis parcial del MPG debido a la actividad de carboxipeptidasas y aspartilproteasas activadas a valores de pH ácidos. Adicionalmente, los residuos tirosina pueden estar involucrados en la formación de puentes de hidrógeno, ya sea como dadores o aceptores de átomos de hidrógeno. En particular, *L. plantarum* mostró el mayor valor de $I_{850/830}$ (3,96 U.A.). Este resultado, junto con el valor obtenido para la banda triptófano, explican la microestructura observada en masas fermentadas por *L. plantarum* (Fig. 20 D). El desarrollo de una microestructura tipo laminar refuerza la hipótesis de interacciones vía puente de hidrógeno entre residuos de tirosina y moléculas de agua, que promueven la generación de una estructura de proteína solvatada.

Tabla 4. Intensidad normalizada de banda triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y ditirosina ($I_{850/830}$) de masas control (C), masas suplementadas con miel (M), masas inoculadas con BAL (LB: *L. bulgaricus*; LF: *L. fermentum*; LP: *L. plantarum*, PP; *P. pentosaceus*) y masas suplementadas con miel e inoculadas con BAL (LBM, LFM, LPM, PPM) luego de 19 h de incubación.

Muestra	Trp (760 cm^{-1})	Tyr (850 cm^{-1})	Tyr (830 cm^{-1})	$I_{850/830}$
C	$0,14 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,06$	$0,25 \pm 0,03$	$1,56 \pm 0,04$
M	$0,27 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,02$	$1,21 \pm 0,02$	$2,24 \pm 0,02$
LB	$0,46 \pm 0,02$	$2,9 \pm 0,08$	$1,07 \pm 0,05$	$2,71 \pm 0,02$
LBM	$0,42 \pm 0,05$	$1,61 \pm 0,06$	$0,59 \pm 0,05$	$2,72 \pm 0,07$
LF	$0,45 \pm 0,02$	$1,6 \pm 0,04$	$0,45 \pm 0,02$	$3,55 \pm 0,05$
LFM	$0,43 \pm 0,04$	$1,65 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,03$	$2,66 \pm 0,04$
LP	$0,78 \pm 0,07$	$2,14 \pm 0,04$	$0,54 \pm 0,03$	$3,96 \pm 0,07$
LPM	$0,45 \pm 0,04$	$1,61 \pm 0,07$	$0,59 \pm 0,02$	$2,72 \pm 0,04$
PP	$0,29 \pm 0,03$	$2,02 \pm 0,03$	$0,92 \pm 0,08$	$2,19 \pm 0,04$
PPM	$0,43 \pm 0,05$	$1,79 \pm 0,06$	$0,77 \pm 0,05$	$2,30 \pm 0,08$

3. Conclusiones

La actividad fermentativa de las BAL y el agregado de miel de *Prosopis* spp. a masas de trigo-centeno modificaron la estructura secundaria y terciaria de las proteínas de gluten.

La actividad de BAL favoreció el incremento de estructuras β -sheets, en detrimento de α -hélice, y estos cambios estuvieron de acuerdo con el intervalo de tiempo en el que ocurrió la acidificación significativa de las muestras. Asimismo, los cambios en la estructura secundaria de las proteínas produjeron un impacto en la microestructura de las mismas, un incremento en el contenido de estructuras β -sheet antiparalelas se asoció al desarrollo de fibras de gluten. Por otra parte, la actividad de ciertas cepas de BAL contribuyó a disminuir el contenido de enlaces disulfuro.

La suplementación con miel contribuyó a la pérdida de estructuras secundarias verdaderas y promovió la formación de nuevos enlaces disulfuro entre proteínas. Estos cambios indujeron el desarrollo de microestructuras que otorgaron al gluten un aspecto de red hiperconectada de proteínas, consistente con su polimerización.

Finalmente, la actividad de BAL revirtió la pérdida de estructuras secundarias experimentada por las proteínas luego del agregado de miel, aumentando el contenido de β -sheets a expensas de *random coils*. Asimismo, la formación de nuevos puentes disulfuro, que había sido observada con el agregado de miel, se mantuvo constante a partir de 12 h de fermentación. Se sugiere que la enzima GOX, durante la fermentación acidoláctica, se alejó de su pH óptimo, evitando la oxidación de grupos tiol entre residuos cisteína y, por lo tanto, formación de nuevos enlaces disulfuro.

CAPÍTULO VII
CONCLUSIONES

Las proteínas son macromoléculas indispensables en nuestra alimentación, cuyo aporte nutricional es fundamental para el desarrollo de numerosas funciones. Además, su presencia, como la de sus aminoácidos constituyentes, contribuye al flavour y a las propiedades funcionales de los alimentos.

En particular, las proteínas de gluten resultan singulares por sus propiedades viscoelásticas, las cuales pueden ser modificadas afectando su estructura secundaria y terciaria.

La estructura secundaria está estabilizada a través de interacciones puente de hidrógeno, hidrofóbicas, iónicas y por enlaces covalentes disulfuro y ditirosina. Cuando alguna de estas interacciones es afectada, las proteínas sufren desnaturalización y sus propiedades se modifican. En el sistema de estudio, macropolímero de gluten (MPG), la estructura secundaria y terciaria fue transformada a través de la actividad de bacterias ácido lácticas (BAL) y a través de la miel. Durante la fermentación se observó una competencia entre las enzimas provenientes de harinas y aquellas provenientes de la miel, cuya actividad es conocida pH-dependiente. Así, el perfil fermentativo de las cuatro BAL estudiadas indujo cambios en las proporciones relativas de las conformaciones secundarias y terciarias, que fueron características para cada BAL y dependieron de su perfil fermentativo.

El gluten de la masa sin inocular o nativo, mostró un predominio de la conformación β -sheet, que contribuyó a la estructura secundaria en aproximadamente 45%. A lo largo de la fermentación, la estructura β -sheet se incrementó en detrimento de las conformaciones α -hélice, β -turn y *random coil*. Esta modificación implica un reordenamiento de las subunidades de proteína, principalmente, de gluteninas.

La actividad fermentativa de *L. bulgaricus* y *P. pentosaceus* se caracterizó por promover el desplegamiento de la proteína. Al finalizar la fermentación la conformación β -

sheet antiparalela duplicó los valores presentes en el gluten nativo. Esta conformación, energéticamente más estable que la conformación β -paralela, resultó en una microestructura que se dispuso espacialmente como red interconectada de fibras de espesor variable.

L. plantarum presentó la pendiente de acidificación más pronunciada. Una elevada concentración de protones promovió la repulsión de subunidades de glutenina, y permitió la interacción por puentes de hidrógeno entre residuos de aminoácidos y moléculas de agua. A este desplegamiento particular de la proteína le correspondió una microestructura laminar, coherente con la formación de una película de proteína solvatada. En concordancia con el incremento de un ambiente hidrofílico, se observó un aumento de la banda triptófano, de 0,14 a 0,79 U.A.

A excepción de masas inoculadas con *L. bulgaricus*, para el resto de las masas fermentadas, la estructura terciaria de las proteínas estuvo caracterizada por una disminución de la banda disulfuro, respecto del gluten nativo, según el proceso hidrolítico que llevan a cabo las proteasas endógenas. En particular, *L. fermentum* experimentó la mayor disminución en la intensidad de esta banda, desde 6,59 a 4,16 U.A. Coincidente con este resultado, la microestructura adquirió un aspecto discontinuo y poco cohesivo. Sin embargo, la suplementación de estas masas con miel mejoró significativamente la cohesividad de la matriz, a través de la formación de nuevos enlaces disulfuro, resultando en una red hiperconectada de proteína. En este caso, la intensidad de banda disulfuro alcanzó un valor de 8,36 U.A., lo cual confirmó un mayor grado de polimerización.

Con respecto al efecto de la suplementación con miel sobre las conformaciones adoptadas por las proteínas, es importante puntualizar que el agregado de miel en masas sin inocular promovió puntos de entrecruzamiento efectivo entre proteínas. Esto se visualizó a través del aumento de banda disulfuro que duplicó su valor original, desde 6,79 a 13,87

U.A. Simultáneamente, la incorporación de miel condujo a la pérdida de estructuras secundarias, al incrementar la proporción relativa de la conformación *random coil* en detrimento de estructuras α -hélice. Estos resultados demuestran que las uniones covalentes, a través de puentes disulfuro, son dominantes a la hora de definir una microestructura más cohesiva.

Para masas inoculadas con *L. fermentum* y *L. plantarum* y suplementadas con miel, se observó un incremento en la intensidad de banda disulfuro respecto de las masas solo fermentadas. Este hecho es el resultado de la competencia entre la actividad glucosa oxidasa (GOX) de la miel y la actividad de proteasas provenientes de harinas que hidrolizan enlaces disulfuro. Contrariamente, la presencia de miel en masas fermentadas por *P. pentosaceus* no tuvo efectos apreciables sobre la intensidad de banda disulfuro, lo cual fue adjudicado a la actividad pseudocatalasa exhibida por esta cepa.

Finalmente, las propiedades viscoelásticas requieren de un ordenamiento espacial de subunidades de proteína que dependerá tanto de la cinética de acidificación de las BAL utilizadas, como de las enzimas presentes. *L. bulgaricus*, *L. plantarum* y *P. pentosaceus* produjeron microestructuras definidas, las cuales mejoraron la continuidad de la matriz proteica. En tanto, *L. fermentum* requirió de un factor externo de entrecruzamiento.

La Fig. 55 resume los eventos más importantes desencadenados durante la fermentación acidoláctica y por compuestos bioactivos presentes en la miel.

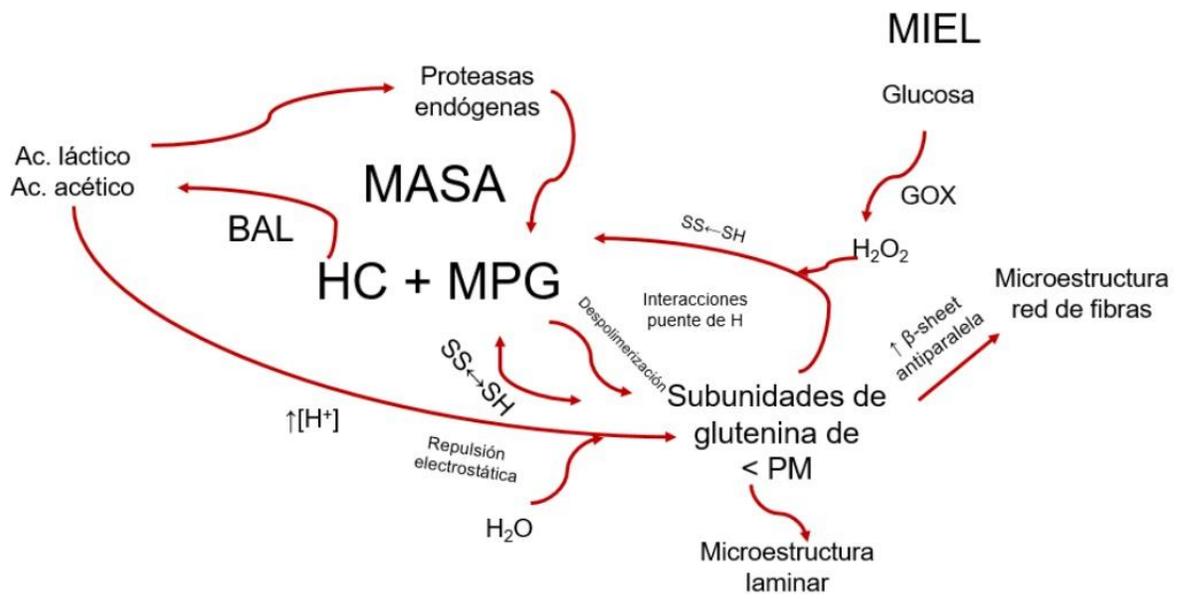


Fig. 55. Eventos simultáneos desarrollados en una masa fermentada por BAL y suplementada con miel. HC: hidratos de carbono, MPG: macropolímero de gluten; SH: tior; SS: enlace disulfuro; GOX: glucosa oxidasa.

Bibliografía

- A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis. 15th. Ed. Arlington, V A. USA. Pp. 521.
- Al-Mamary, M., Al-Meer, A., Al-Habori, M. 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, 22, 1041-1047.
- Al-Waili, N.S. 2004. Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *Journal of Medicinal Food*, 7, 210- 222.
- Aponte, M., Boscanio, F., Sorrentino, A., Coppola, R., Masi, P., Romano, A. 2014 Effects of fermentation and rye flour on microstructure and volatile compounds of chestnut flour based sourdoughs. *LWT- Food Science and Technology*, 58, 387-395.
- Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Salminen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A., Eds., Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3rd Edition, Marcel Dekker, New York, pp.1-67.
- Bang, L.; Bunting, C., Molan, P. 2003. The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 9, 267-273.
- Barber, S., Báguena, R., Bénédict Barber, C., Martínez-Anaya, A. 1991. Evolution of biochemical and rheological characteristics and breadmaking quality during a multistage wheat sour process. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 192, 46-52.
- Barth, A. 2007. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochemica et Biophysica*, 1767, 1073-1101.

- Belton P.S. 1999. On the elasticity of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 29, 103-107.
- Bernklau, I., Lucas, L., Jekle, M., Becker, T. 2018. Protein network analysis: A new approach for quantifying what dough microstructure. *Food Research International*, 89, 812-819.
- Bhajattachjie, N., Biswas, P. 2010. Position-specific propensities of amino acids in the β -strand. *BMC Structural Biology*, 10, 1-29.
- Bianchi, E. M.1990. Control de la miel y de la cera. Centro de Investigaciones Apícolas Universidad Nacional de Santiago del Estero, República Argentina. Pp. 1-64.
- Biesiekierski, J.R., Iven, J. Non-celiac gluten sensitivity: piecing the puzzle together. 2015. *United European Gastroenterology Journal*, 3 (2): 160-165.
- Bleukx, W., Delcour, J.A., 2000. A second aspartic proteinase associated with wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 32, 31–42.
- Brock, J.E., Damodaran, S. 2013. Bran induced changes in water structure and gluten conformation in model gluten dough studied by Fourier Transform infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 31, 146-155.
- Bogdanov, S. 1997. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *LWT- Food Science and Technology*, 30, 748-753.
- Bonet, A., Rosell, C.M., Caballero, P.A., Gómez, M., Pérez-Munuera, I., Lluch, M.A. 2006. Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: A study from macroscopic to molecular level. *Food Chemistry*, 99, 408-415.
- Brandt, N.N., Chikishav, A.I., Golovin, A.V., Kruzhillin, V.N., Zalevsky, A.O. 2014. Raman spectroscopy of disulphide bridges in thrombin. *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, 3, 287-292.

- Butterfield, C.T. (1932). The selection of a dilution water for bacteriological examinations. *Journal of Bacteriology*, 23, 355-368.
- Carter y Thornburg. 2004. Is the nectar redox cycle a floral defense against microbial attack? *Trends in Plant Science*, 9, 320-324.
- Clarke, C.I., Schober, T.J., Dockery, P., O'Sullivan K., Arendt, E.K. 2004. Wheat sourdough fermentation: Effects of time and acidification on fundamental rheological properties. *Cereal Chemistry*, 81 (3), 409-417.
- Collar, C. 1996. Biochemical and technological assessment of the metabolism of pure and mixed cultures of yeast and lactic acid bacteria in breadmaking applications. *Food Science and Technology International*, 2, 349-367.
- Corsetti, A., De Angelis, M., Dellaglio, F., Paparella, A., Fox, P.F., Settani, L., Gobetti, M. 2003. Characterization of sourdough lactic acid bacteria based on genotypic and cell-wall protein analyses. *Food Microbiology*, 24, 592-600.
- Corsetti, A. y Settani, L. 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation: Review. *Food Research International*, 40: 539-558.
- Csonka, L.N. 1989 Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 53: 121-147.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Corsetti, A., Lavermicocca, P., Arnault, P., Tossut, P., Gallo, G., Gobetti, M. 2003. Interactions between sourdough lactic acid bacteria and exogenous enzymes: effects on the microbial kinetics of acidification and dough textural properties. *Food Microbiology*, 20, 67-75.
- Dobrogosz, W.J., Stone, R.W. 1962. Oxidative metabolism in *Pediococcus pentosaceus*. *Journal of Bacteriology*, 84, 716-723.
- Dombkowski, A.A., Sultanak, Z., Craig D.B. 2014. Protein disulfide engineering. *FEBS Letters*, 588, 206-212.

- Dunnewind, B., van Vliet, T., Orsel, R. 2002. Effect of oxidative enzymes on bulk rheological properties of wheat flour doughs. *Journal of Cereal Science*, 36, 357–366.
- Eliasson, A.C. 1998. Protein-carbohydrate interactions. En: Hamen, E.J., Hosney, R.C. Eds., *Interactions: The key to cereal quality*. American Association of Cereal Chemists, Minnesota, pp.52-54.
- Ellepola, S.W., Choi, S.M., Phillips, Ma, C.Y. 2006. Raman spectroscopic study of rice globulin. *Journal of Cereal Science*, 43, 85-93.
- Engesser, D.M. y Hemmes, W.P. 1994. Non-heme catalase activity of lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 17, 11-19.
- Ferreira, I.C.F.R., Aires, E., Barreira, J.C.M., Estevinho, L.M. 2009. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114, 1438-1443
- Ferrer, E.G., Gómez, A.V., Añón, M.C., Puppo, M.C. 2011. Structural changes in gluten protein structure after addition of emulsifier. A Raman spectroscopy study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79, 278-281.
- Ferri, M., Serrazanetti, D.I., Tassoni, A., Baldissarri, M., Gianotti, A. 2016. Improving the functional and sensorial profile of cereal-based fermented foods by selecting *Lactobacillus plantarum* strains via a metabolomics approach. *Food Research International*, 89, 1095-1105.
- Fooks, A.H., Martin, A.C.R., Woolfson, R.B. 2006. Sessions, E.G. Hutchinson, Amino acid pairing preferences in parallel β -sheets in protein. *Journal of Molecular Biology*, 356, 32-44.

- Fukui, S., Or, A., Obayashi, A., Kitahara, K. 1957. Studies on the pentose metabolism by microorganisms: A new type lactic-acid fermentation of pentoses by lactic acid bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology*, 3, 258-268.
- Gallagher, W. 1997. FTIR analysis of protein structure. *Biochemistry*, 392, 662-666.
- Gänzle, G.M., Loponen, J., Gobetti, M. 2008. Proteolysis in sourdough fermentation: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 513-521.
- Garnero, S., Sposetti, P., Garnero, J., Luengo, F., Yafar, E. 2017. Pentosanos totales y solubles en la fracción de harina de variedad de trigos argentinos. Facultad Regional de San Francisco. Universidad Tecnológica Nacional.
- Gheldof, N.; Wang, X.H., Engeseth, N. 2002. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5870-5877.
- Gerez, C.A., Dallagnol, A., Rollán, G., Font de Valdez, G. 2012. A combination of two lactic acid bacteria improves the hydrolysis of gliadin during wheat dough fermentation. *Food Microbiology*, 32, 427-430.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Rossi, J., 1995. Maltose-fructose co-fermentation by *Lactobacillus brevis* subsp. *lindneri* Cb 1 fructose negative strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42, 939-944.
- Gómez, A.V., Ferrer, E.G., Añón, M.C., and Puppo, M.C. 2013. Changes in secondary structure of gluten proteins due to emulsifiers. *Journal of Molecular Structure*, 1033, 51-58.
- Grosch, W., Wieser, H. 1999. Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. *Journal of Cereal Science*, 29, 1-16.

- Harrison, P.M., Sternber, M.J. 1996. The disulfide beta-cross: from cystine geometry and clustering to classification of small disulfide-rich protein folds, *Journal of Molecular Biology*, 264, 603-623.
- Henriques, A., Jackson, S., Cooper, R., Burton, N. 2006. Free radical production and quenching in honeys with wound healing potential. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 773-777.
- Herzberg, G. 1991. *Molecular Spectra and Molecular Structure II: Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules*, Krieger Publishing.
- Holder, B.H. 2012. Characterization of starch by vibrational spectroscopy. Dissertations, Thesis and Student Research in Food Science and Technology, Universidad of Nebraska.
- Hoseney, R.C., Finney, K., Shagnen, M.D., Pomeranz, Y. 1969. Functional (breadmaking) and biochemical properties of wheat flour components II: Role of water-solubles. *Cereal Chemistry* 46, 117-125.
- Isla, M.I., Craig, A., Ordoñez, R., Zampini, C., Sayago, J., Bedascaburre, E., Salomón, V., Maldonado, L. 2011. Physico chemical and bioactive properties of honey from Northwestern Argentina. *LWT- Food Science and Technology*, 44, 1922-1930.
- Iurlina, M. O. 2011. Tesis Doctoral. Actividad antimicrobiana de la miel y propóleos. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Iurlina, M.O., Saiz, A.I., Fritz, R., Manrique, G. 2009. Major flavonoids of Argentinian honeys. Optimization of the extraction method and analysis of their content in relationship to the geographical source of honeys. *Food Chemistry*, 115, 1141-1149.
- Jay, J.M. 2000. *Microbiología moderna de los alimentos*. Cuarta edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España, pp. 19-27, 106-108, 441-475.

- Joye, I.J., Lagrain, B., Delcour, J.A. 2009. Use of chemical redox agents and exogenous enzymes to modify the protein network during breadmaking-A review. *Journal of Cereal Science*, 50, 11-21.
- Koehler, P., Wieser, H. 2013. Chemistry of cereal grains. En: Gobetti, M., Gänzle, M. Eds., *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer, New York, pp. 11-45.
- Kishore, R.K., Halim, A.S., Syazana, M.S., Sirajudeen, K.N.S. 2011. Tulang honey has phenolic content and greater radical scavenging activity compared with other honey sources. *Nutrition Research*, 31, 185-196.
- Kong, J y Shaoning, Y.U. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39 (8), 549-559.
- Kücük, M.; Kolayli,S.; Karaoglu, S; Ulusoy, E.; Baltaci, C.; Candan, F. 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100 (2), 526-253.
- Lahtinen, S.J., Davis, E., Ouwehand, A.C. 2012. Lactobacillus species causing obesity in humans: where is the evidence? *Beneficial Microbes*, 3, 171-174.
- Le Breton, Y., Pichereau, V., Sauvageot, V., Auffray, Y., Rince, A. 2005. Maltose utilization in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 806-813.
- Linlaud, N., Ferrer, E., Puppo, Ferrero, C. 2011. Hydrocolloid interaction with water, protein, and starch in wheat dough. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 713-719.
- Loponen, J.m Mikola, M., Katina, K., Sontag-Strohm, T., Salovaara, H. 2004. Degradation of HMW glutenins during wheat sourdough fermentations. *Cereal Chemistry*, 81, 87-89.
- Lucas, I., Stauner, B., Jekle, M., Becker, T. 2018. Staining methods for dough systems – Impact on microstructure and functionality. *LWT-Food Science and Technology*, 88, 139-145.

- Makino, K., Hagi, A., Ide, H., Murakami, A., Nishi, M. 1992. Mechanic studies on the formation of aminoxyl radicals from 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide in Fenton systems. Characterization of key precursors of giving rise to background ESR signals. *Canadian Journal of Chemistry*, 70, 2818-2827.
- Martinez-Anaya, M.A. 1996. Enzymes and bread flavot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2469-2480.
- McCann, T.H., Day, L. 2013. Effect of sodium chloride on gluten network formation, dough microstructure and rheology in relation to breadmaking. *Journal of Cereal Science*, 57, 444-452.
- Miller, K.A., Hosney, R.C. 1999. Dynamic rheological properties of wheat starch gluten doughs. *Cereal Chemistry*, 76 (1), 105-109.
- Molan, P.C.; Willix, D.J., Harfoot, C.G. 1992. A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of Manuka honey and other honey. *Journal of Applied Bacteriology* 73, 388-394.
- Murray, J.E., Laurieri, N., Delgoda, R. 2017. Proteins. En: Basic Animal Anatomy and Physiology. Badal, S., Delgoda, R. Eds., *Pharmacognosy*. Pp. 477-494.
- Nawrocka A., Szymanska-Chargot, M., Mis, A., Kowalski, R., Gruszecki, W.I. 2016. Raman studies of gluten proteins aggregation induced by dietary fibers. *Food Chemistry*, 194, 86-94.
- Nawrocka A., Szymanska-Chargot, M., Mis, A., Wilczewska, A.Z., Markiewicz K.H. 2017. Aggregation of gluten proteins in model dough after fibre polysaccharide addition. *Food Chemistry*, 231, 51-60.

- Neubauer, H., Glaasker, E., Hammes, W.P. 1994. Mechanism of maltose uptake and glucose excretion in *Lactobacillus sanfrancisco*. *Journal of Bacteriology*, 176, 544-548.
- Nutter, J., Fritz, R., Iurlina, M.O., Saiz, A.I. 2016. Effect of *Prosopis* sp. honey on the growth and fermentative ability of *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus fermentum*. *LWT Food Science and Technology*, 70, 309-314.
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., Montonati, M. 2007. Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, 25, 20-33.
- Pan, Y., Nigles, M.J. 2014. Electron paramagnetic resonance spectroscopy: Basic principles, experimental techniques and applications to Earth and Planetary sciences. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 78, 655-690.
- Parra-Huertas, R. A. 2010. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, 8, 94-105.
- Parisien, M., Major, F. 2007. Ranking the factors that contribute to protein β -sheet folding. *Proteins*, 68, 824-829.
- Peñaflor, N.M. y Guerrero, A.G. 2007. Susceptibilidad de las bacterias ácido lácticas frente a diversos antibióticos. Tesis de grado, Licenciatura en Química de Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Centro de Investigaciones Químicas.
- Petsko, G.A., Ringe, D. 2004. Protein structure: From sequence to Structure. New Science Press Limited. London, UK, pp. 1-47.
- Rasheed, F., 2005. Tailoring the structure function relationship in wheat gluten. Tesis doctoral. Swedish University of Agricultural Sciences.

- Rasiah, I. A.; Sutton, K.H.; Low, F.L.; Lin, H.M., Gerrard, J.A. 2005. Crosslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on bread and croissants. *Food Chemistry*, 89, 325-332.
- Rizzello, C.G., Curiel, I.A., Nionelli, L., Vicentini, O., Di Cagno, R., Silano, M., Gobbetti, M., Coda, R. 2013. Use of fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten. *Food Microbiology*, 30, 1-10
- Rocken, S. 1996. Applied aspects of sourdough fermentation. *Advances in Food Science*, 18, 212-216.
- Rygula, A., Majzner, K., Marzec, K.M., Kaczor, A., Plarczyk, M., Baranska, M. 2013. Raman Spectroscopy of proteins: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*, 44 (8), 1061-1076.
- Salovaara, H. 1998. Lactic acid bacteria in cereal and based products. En Salminen, S., Wright, A. Eds., *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, Marcel Dekker, New York, pp. 431-451.
- Saiz, A. I. 2011. Tesis Doctoral. Acción metabólica de los microorganismos en una masa panificable. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Serrazanetti, D.I., Guerzoni, M.E., Corsetti, A., Vogel, R. 2009. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiology*, 26, 700-711.
- Shamala, T. R.; Shri Jyothi, Y., Saibaba, P. 2000. Stimulatory effect of honey on multiplication of lactic acid bacteria under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 453-455.

- Shewry, P.R., Tatham, A.S. 1997. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *Journal of Cereal Science*, 25, 207-227.
- Shewry P.R., Popineau Y., Lafiandra D., Belton P. 2001. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the Eurowheat Project. *Trend in Food Science and Technology*, 11, 433-441.
- Sivam, A.S., Sun-Waterhouse, D., Perera, C.O., Waterhouse, G.I.N. 2013. Application of FT-IR and Raman spectroscopy for the study for the study of biopolymers in breads fortified with fibre and polyphenols. *Food Research International*, 50, 574-585.
- Smith, L.J., Fiebig, K.M, Schalbe, H., Dobson, C.M.1996. The concept of a *random coil* residual structure in peptides and denatured proteins. *Folding and Design*, 1, 95-106.
- Steffolani, M.E., Ribotta, P.D., Pérez, G.T., León, A.E. 2010. Effect of glucose oxidase, transglutaminase, and pentosanase on wheat proteins: Relationship with dough properties and bread-making quality. *Journal of Cereal Science*, 51, 366-373.
- Stolz, P., Rudi, F., Vogel, W., Hammes, P. 1995. Utilization of electron acceptors by *lactobacilli* isolated from sourdough. *Zeitschrift Fur Lebensmittel*, 201, 402-410.
- Taormina, P. J.; Niemira, B. A., Beuchat, L. R. 2001. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influence by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 217-225.
- Tatham A. 1995. The structures of wheat protein. En: Wheat Structure. Biochemistry and Funcctionality. Schofield Ed., *Journal of the Royal Society of Chemistry*, England, pp. 53-63.
- Tian, F., Decker, E.A., Goddard, J.M. 2013. Controlling lipid oxidation of foods by active packaging technologies. *Food and Function*, 4, 669-680.

- Tilley, K.A., Benjamin, R.E., Bagorogoza, K.E., Okot-Kotber, B.M., Prakash, O., Kwen, H. 2001. Tyrosine cross-links: molecular basis of gluten structure and function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2627-32.
- Van Wart, H.E., Lewis, A., Scheraga, H.A., Saeva, F.D. 1973. Disulfide bond dihedral angles from Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70 (9), 2619-2623.
- Vermeulen, N., Kretzer, J., Machalitze, H., Vogel, R.F., Gänzle, M.G. 2006. Influence of redox-reactions catalyzed by homo- and hetero- fermentative lactobacilli on gluten in wheat sourdoughs. *Journal of Cereal Science*, 43, 137-143.
- Vermulapalli, V., Miller, K.A., Hosney, R.C. 1998. Glucose oxidase in breadmaking systems. *Cereal Chemistry*, 75 (4), 439-442.
- Vernocchi, P., Ndagijimara, M., Serrazanetti, D., Giamotti, A., Vallicelli, M., Guernozi, E. 2008. Influence of starch addition and dough microstructure on fermentation aroma production by yeast and lactobacilli. *Food Chemistry*, 108, 1217-1225.
- Vrancken, G.; Rimaux, T.; De Vuyst, L., Leroy, F. 2008. Kinetic analysis of growth and sugar consumption by *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 reveals adaptation to the acidic sourdough ecosystem. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 58-66.
- Weiss, N. Schillinger, U., Kandler, O. 1983. *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmannii* and *Lactobacillus bulgaricus*, subjective synonyms of *Lactobacillus delbrueckii*, and description of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* comb. nov and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* comb. nov. *Applied Microbiology*, 4, 552-557.
- Wellner, N. 2013. Fourier-transform infrared (FT-IR) and Raman microscopy: principles and applications to food microstructures. En: Morris, V., Groves, K. Eds., *Food microstructures: Microscopy, measurement and modeling*, Elsevier, London, pp-163-191).

- Wieser, H. 1996. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatrica*, 412, (85), 3–9.
- Wieser, H. 2003. The use of redox agents. En: Cauvain, S.P. Ed., Bread making-improving quality. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, pp. 424–446.
- Wieser, H. 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24, 115-119.
- Wrigley C., Andrews J, Bekes F, Gras P, Gupta R, MacRitchie F, Skerritt J. 1998. Protein-protein interactions-essential to dough rheology. En: *Interactions: The Keys to Cereal Quality*. Editado por Hamer R, Hosenev R. American Association of Cereal Chemists, USA. pp. 18-20.
- Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., D’Arcy, B., Datta, N., Caffin, N., Raymont, K. 2004. Flavonoids in Australian Melaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksia and Helianthus honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*, 37, 166-174.
- Yamamoto, S., Furukawa, T., Bour, P., Ozaki, Y. 2014. Solvated states of poly-L-alanine α -helix explored by Raman optical activity. *The Journal of Physical Chemistry A*, 118, 3655-3662.
- Zhang, N., Ruan, J., Duan, G., Gao, S., Zhang, T. 2009. The interstrand amino acids play a significant role in determining the parallel or antiparallel orientation of β -strands. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386, 537-543.
- Zhang, H., Claver, I.P., Li, Q., Zhu, K., Peng, W., Zhou, H. 2012. Structural modification of wheat gluten by dry heat-enhanced enzymatic hydrolysis. *Food Technology and Biotechnology*, 50, 53-58.

Anexo de tablas

Tabla 5. Recuentos de BAL, valores de pH y TTA en masas de trigo-centeno incubadas durante 19 h. Control (C), inoculadas con *L. bulgaricus* (LB), *L. fermentum* (LF), *L. plantarum* (LP), *P. pentosaceus* (PP), con miel (M), con miel e inoculadas con *L. bulgaricus* (LBM), *L. fermentum* (LFM), *L. plantarum* (LPM), *P. pentosaceus* (PPM).

Masa	Tiempo (h)	Recuento de células (Log UFC/g masa)	pH	TTA (ml NaOH/10 g masa)
C	0	2,32 ± 0,18	6,61 ± 0,07	0,8 ± 0,05
	6	2,78 ± 0,14	6,69 ± 0,22	1,2 ± 0,03
	12	3,31 ± 0,12	6,53 ± 0,09	1,1 ± 0,02
	19	3,74 ± 0,11	6,37 ± 0,15	2,3 ± 0,04
M	0	3,61 ± 0,39	6,18 ± 0,1	1,43 ± 0,32
	6	3,89 ± 1,24	5,98 ± 0,34	1,4 ± 0,28
	12	4,06 ± 0,44	6,02 ± 0,47	1,76 ± 0,15
	19	4,69 ± 0,38	5,71 ± 0,27	2,1 ± 0,2
LB	0	8,5 ± 0,2	6,11 ± 0,1	1,1 ± 0,12
	6	8,63 ± 0,36	5,81 ± 0,12	2,7 ± 0,09
	12	10,13 ± 0,25	5,53 ± 0,11	5,6 ± 0,2
	19	11,17 ± 0,46	4,56 ± 0,24	11,8 ± 0,05
LBM	0	8,47 ± 0,29	6,11 ± 0,47	1,3 ± 0,21
	6	9,8 ± 0,62	5,72 ± 0,2	2,8 ± 0,37
	12	11,3 ± 0,29	4,54 ± 0,12	7,5 ± 0,55
	19	12,3 ± 0,25	4,33 ± 0,07	11,2 ± 0,66
LF	0	8,5 ± 0,2	6,15 ± 0,15	0,6 ± 0,06
	6	8,8 ± 0,4	5,41 ± 0,19	2,9 ± 0,12
	12	10,23 ± 0,15	4,45 ± 0,09	7,2 ± 0,15
	19	11,0 ± 0,3	4,04 ± 0,07	11,7 ± 0,06

LFM	0	$8,52 \pm 0,38$	$6,13 \pm 0,17$	$1,3 \pm 0,34$
	6	$8,86 \pm 0,53$	$5,76 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,7$
	12	$10,5 \pm 0,45$	$4,68 \pm 0,12$	$6,5 \pm 0,8$
	19	$10,6 \pm 0,61$	$4,04 \pm 0,07$	$9,1 \pm 1,7$
LP	0	$8,48 \pm 0,23$	$6,22 \pm 0,12$	$0,8 \pm 0,05$
	6	$9,43 \pm 0,06$	$5,0 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,21$
	12	$9,81 \pm 0,14$	$3,86 \pm 0,18$	$9,8 \pm 0,07$
	19	$11,22 \pm 0,24$	$3,72 \pm 0,08$	$16,3 \pm 0,05$
LPM	0	$8,49 \pm 0,15$	$5,9 \pm 0,11$	$1,4 \pm 0,2$
	6	$10,09 \pm 0,21$	$5,0 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,3$
	12	$11,34 \pm 0,32$	$4,69 \pm 0,16$	$8,6 \pm 0,2$
	19	$11,8 \pm 0,22$	$3,8 \pm 0,04$	$16,0 \pm 0,3$
PP	0	$8,43 \pm 0,08$	$6,14 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,02$
	6	$8,6 \pm 0,26$	$5,08 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,08$
	12	$9,55 \pm 0,18$	$3,77 \pm 0,16$	$9,6 \pm 0,03$
	19	$11,2 \pm 0,33$	$3,73 \pm 0,05$	$12,3 \pm 0,09$
PPM	0	$8,34 \pm 0,08$	$5,61 \pm 0,26$	$1,43 \pm 0,23$
	6	$8,6 \pm 0,16$	$5,43 \pm 0,18$	$2,8 \pm 0,7$
	12	$9,55 \pm 0,14$	$4,51 \pm 0,32$	$12,6 \pm 1,3$
	19	$11,2 \pm 0,32$	$3,81 \pm 0,17$	$15,3 \pm 1,5$

Tabla 6. Proporción relativa de elementos de la estructura secundaria de proteínas de gluten. β ST: β -sheet total; β SA: β -sheet antiparalela; β -sheet paralela; α H: α hélice; SH: hélice solvatada; T: β -turn; RC: *random coil*. Control (C), inoculadas con *L. bulgaricus* (LB), *L. fermentum* (LF), *L. plantarum* (LP), *P. pentosaceus* (PP), con miel (M), con miel e inoculadas con *L. bulgaricus* (LBM), *L. fermentum* (LFM), *L. plantarum* (LPM), *P. pentosaceus* (PPM).

Masa	Tiempo (h)	β ST	β SA	β SP	α H	SH	β T	RC
C	0-19	45 \pm 1,2	15 \pm 1,1	30 \pm 1,7	26 \pm 2,1	14 \pm 1,1	15 \pm 1,3	ND
M	0-19	40 \pm 1,09	12 \pm 0,8	28 \pm 1,4	15 \pm 1,1	12 \pm 1,3	12 \pm 1,3	21 \pm 1,1
LB	0	45 \pm 3,2	18 \pm 3,7	27 \pm 4,5	29 \pm 2,1	10 \pm 3,0	16 \pm 2,4	ND
	6	50 \pm 2,1	22 \pm 1,1	28 \pm 2,1	20 \pm 4,3	14 \pm 1,8	15 \pm 2,2	ND
	12	43 \pm 1,7	18 \pm 2,0	25 \pm 2,9	25 \pm 2,7	11 \pm 1,0	17 \pm 2,9	4 \pm 1,9
	19	60 \pm 2,4	32 \pm 2,5	28 \pm 2,5	11 \pm 1,1	16 \pm 2,3	12 \pm 1,1	1 \pm 0,3
LBM	0	39 \pm 3,0	12 \pm 3,2	27 \pm 2,9	17 \pm 1,4	12 \pm 2,5	14 \pm 3,2	18 \pm 2,8
	6	54 \pm 2,5	12 \pm 1,9	42 \pm 1,7	15 \pm 3,6	15 \pm 2,3	11 \pm 2,7	5 \pm 1,0
	12	53 \pm 1,9	12 \pm 2,4	46 \pm 2,9	17 \pm 2,3	14 \pm 1,6	13 \pm 1,6	4 \pm 2,1
	19	82 \pm 2,4	4 \pm 2,2	78 \pm 2,3	2 \pm 1,8	16 \pm 1,3	2 \pm 1,3	4 \pm 1,7
LF	0	43 \pm 3,1	18 \pm 2,8	25 \pm 2,9	25 \pm 4,1	15 \pm 1,3	17 \pm 2,0	ND
	6	48 \pm 1,8	19 \pm 2,2	29 \pm 2,2	26 \pm 3,1	14 \pm 1,1	13 \pm 2,1	3 \pm 1,1
	12	66 \pm 3,7	10 \pm 2,0	56 \pm 4,1	7 \pm 2,1	14 \pm 3,0	12 \pm 1,1	2 \pm 0,3
	19	49 \pm 1,9	22 \pm 1,7	27 \pm 2,3	25 \pm 3,0	10 \pm 2,8	13 \pm 0,9	3 \pm 1,4
LFM	0	43 \pm 1,7	12 \pm 1,5	31 \pm 1,9	14 \pm 1,7	12 \pm 1,5	12 \pm 2,4	19 \pm 1,2
	6	52 \pm 2,5	28 \pm 3,0	24 \pm 2,0	14 \pm 2,6	12 \pm 2,0	12 \pm 1,7	10 \pm 1,9
	12	61 \pm 1,1	34 \pm 2,4	27 \pm 1,8	15 \pm 2,0	10 \pm 2,0	10 \pm 2,0	6 \pm 2,0
	19	66 \pm 1,1	28 \pm 0,9	38 \pm 1,3	8 \pm 1,4	13 \pm 1,9	13 \pm 0,9	7 \pm 1,7
LP	0	45 \pm 1,7	16 \pm 2,1	29 \pm 2,3	25 \pm 3,0	15 \pm 3,0	14 \pm 1,7	ND
	6	50 \pm 2,5	20 \pm 1,0	30 \pm 1,4	24 \pm 2,0	11 \pm 2,4	13 \pm 2,9	2 \pm 0,2
	12	79 \pm 4,1	15 \pm 2,1	64 \pm 1,5	27 \pm 1,8	10 \pm 1,9	2 \pm 0,7	5 \pm 0,5
	19	55 \pm 2,9	18 \pm 1,5	37 \pm 2,0	38 \pm 1,3	12 \pm 1,9	3 \pm 1,0	4 \pm 1,2

LPM	0	41 ± 1,5	13 ± 1,4	28 ± 1,5	15 ± 1,4	12 ± 2,3	15 ± 1,6	18 ± 2,3
	6	47 ± 1,7	22 ± 0,8	25 ± 1,7	16 ± 2,3	9 ± 1,8	14 ± 1,1	14 ± 1,3
	12	62 ± 2,0	22 ± 1,3	40 ± 1,3	9 ± 2,1	13 ± 0,9	10 ± 1,0	6 ± 1,3
	19	67 ± 2,1	21 ± 1,5	46 ± 1,0	6 ± 2,0	11 ± 1,1	11 ± 2,1	5 ± 1,8
PP	0	45 ± 3,5	15 ± 1,9	30 ± 2,6	26 ± 1,2	13 ± 2,0	16 ± 2,2	ND
	6	45 ± 1,8	17 ± 2,0	28 ± 1,5	30 ± 3,1	16 ± 2,9	9 ± 2,0	ND
	12	77 ± 3,0	20 ± 1,5	57 ± 2,3	2 ± 0,7	16 ± 2,1	5 ± 1,3	ND
	19	61 ± 2,3	31 ± 3,0	30 ± 1,2	11 ± 2,3	7 ± 1,9	7 ± 2,5	14 ± 3,2
PPM	0	40 ± 2,4	12 ± 1,1	28 ± 2,1	14 ± 1,5	13 ± 0,9	15 ± 3,1	18 ± 3,1
	6	60 ± 1,8	30 ± 2,4	30 ± 2,6	13 ± 0,7	11 ± 2,0	13 ± 2,6	3 ± 0,3
	12	35 ± 1,2	17 ± 2,4	22 ± 0,6	26 ± 1,0	17 ± 1,6	17 ± 1,4	5 ± 1,0
	19	37 ± 2,1	18 ± 1,6	19 ± 2,3	24 ± 2,0	16 ± 2,8	19 ± 2,4	4 ± 1,7

Tabla 7. Intensidad de banda disulfuro (480 cm⁻¹) de proteínas de gluten en masas fermentadas sin y con miel agregada a 19 h de fermentación. Control (C), inoculadas con *L. bulgaricus* (LB), *L. fermentum* (LF), *L. plantarum* (LP), *P. pentosaceus* (PP), con miel (M), con miel e inoculadas con *L. bulgaricus* (LBM), *L. fermentum* (LFM), *L. plantarum* (LPM), *P. pentosaceus* (PPM).

Masa	I ₄₈₀
C	6,59 ± 0,6
M	13,87 ± 0,72
LB	14,22 ± 0,75
LBM	8,81 ± 0,3
LF	4,16 ± 0,5
LFM	8,36 ± 0,3
LP	5,56 ± 0,13
LPM	8,87 ± 0,12
PP	5,56 ± 0,3
PPM	5,65 ± 0,2

Anexo espectros Raman

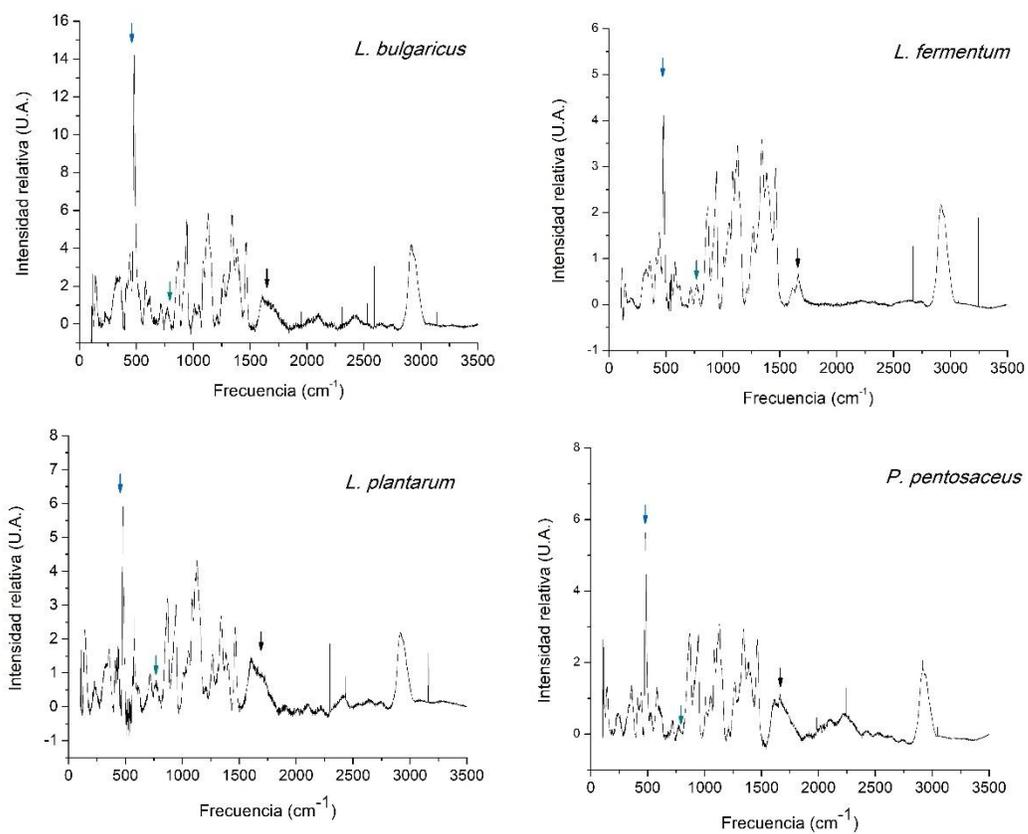


Fig 56. Espectros Raman. Masas fermentadas por las respectivas BAL durante 19 h. Flecha azul: banda disulfuro; flecha verde: banda triptófano; flecha negra: banda Amida I

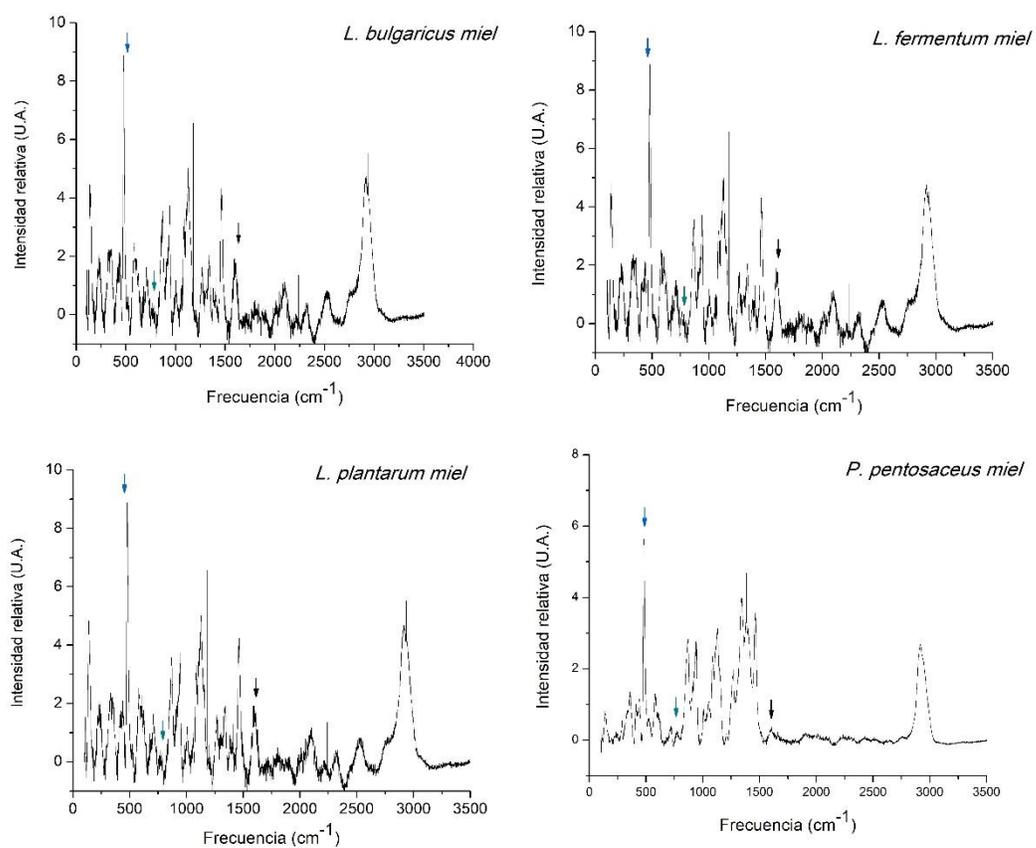


Fig.57. Espectros Raman. Masas con miel y fermentadas por las respectivas BAL durante 19 h. Flecha azul: banda disulfuro; flecha verde: banda triptófano; flecha negra: banda Amida I

Anexo de soluciones

Solución buffer fosfato 0,2 M pH 6,5. Se preparó una solución de fosfato monosódico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$) 2,76% (p/v) y una solución de fosfato disódico ($\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$) 2,84% (p/v). Se mezclaron 68,5 ml de la primera solución con 31,5 ml de la segunda en matraz aforado de 200 ml y se completó a volumen con agua desionizada.

Solución de almidón 0,1% (p/v). Se pesaron 0,05 g de almidón soluble en 25 ml de agua desionizada y la solución fue calentada a ebullición durante 3 minutos. Simultáneamente se agregaron 1,25 ml de ácido clorhídrico (HCl) concentrado en 20 ml de agua desionizada. Se transfirieron ambas soluciones a matraz de 50 ml y se completó el volumen con agua desionizada.

Solución buffer acetato pH 5,3. Se disolvieron 87 g de acetato de sodio trihidratado en 400 ml de agua desionizada al cual se le agregaron 10,5 ml de ácido acético glacial. La solución se transfirió en matraz de 500 ml y se completó el volumen con agua desionizada. Finalmente, se ajustó el valor de pH a 5,3 con acetato de sodio o ácido acético glacial.

Solución de trabajo de yodo 0,01 N. Esta solución se preparó a partir de una solución madre de yodo y una de fluoruro de sodio (FNa) 2% (p/v). Con tal objetivo, se disolvieron 20 g IK en 40 ml de agua desionizada. La solución se transfirió a matraz de 1 litro, se añadieron 12,7 g de I_2 p.a. resublimado, se dejó reposar durante 20 min, se llevó a volumen, se homogeneizó y se conservó en un ambiente frío y oscuro.

Solución 5,5,-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO). Se pesaron 10 mg de DMPO y se completó el volumen a 1 ml con agua bidestilada. La solución se protegió de la luz y se utilizó en el día.

Solución FeSO₄. Solución madre FeSO₄ 0,05M. Se pesaron 44 mg de FeSO₄ y se llevaron a 10 ml con agua bidestilada. *Solución FeSO₄ 0,02 M.* Se tomaron 400 µl de solución FeSO₄ 0,05M y se llevaron a 10 ml con agua bidestilada. Se protegió de la luz y se utilizó en el día.

Solución Buffer-fosfato de Butterfield: Solución stock. Se disolvieron 34 g de KH₂PO₄ en 500 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 7,2 con NaOH 0,1 M, se transfirió a matraz y se completó el volumen a 1 litro con agua desionizada. Se fraccionó y esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos. *Solución de dilución.* Se tomaron 1,25 ml de solución stock y se llevaron a 1 litro con agua desionizada.

Solución de trabajo. Tomar 1,25 ml de solución stock y llevar a 1 litro con agua desionizada. Esterilizar 15 minutos a 121 °C. Se fraccionó y esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos.