



---

**Universidad de Valladolid**

**FACULTAD DE MEDICINA**

TRABAJO DE FIN DE GRADO  
**NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA**

---

# Calidad Microbiológica del Pan: *Bacillus cereus*

---

PRESENTADO POR: **SARA PORTALES PINO**

TUTELADO POR: **IRMA CARO CANALES**

Departamento de Pediatría e Inmunología, Obstetricia y Ginecología, Nutrición y  
Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia

*Valladolid, 2019 – 2020*

## RESUMEN

---

El pan es considerado un producto fundamental en la alimentación de muchos países. *B. cereus* es un microorganismo esporulado, anaerobio facultativo y sus esporas pueden germinar a temperaturas entre 5 y 55 °C y en  $a_w \geq 0,92$ . Estas son capaces de soportar el proceso de horneado del pan y pueden germinar cuando se lleva a cabo un enfriamiento lento de este producto. El objetivo de este trabajo fue conocer y valorar los parámetros de crecimiento de *B. cereus* en diversos panes elaborados artesanal e industrialmente, a través de la determinación de sus factores intrínsecos y la posterior predicción de crecimiento de este. Para ello, se analizaron la  $a_w$ , el pH y el NaCl, tanto de la miga como de la corteza, en los distintos tipos panes. Además, se llevó a cabo la predicción del crecimiento de *B. cereus* a pH y  $a_w$  medios, mínimos y máximos utilizando la base de datos *ComBase*. Los valores de  $a_w$  encontrados oscilaron entre 0,811 a 0,939 para la corteza y entre 0,959 a 0,980 para la miga. El rango de pH fue 5,56 a 5,82 para la corteza y de 5,54 a 6,05 para la miga. No se observaron diferencias significativas entre los distintos tipos de panes para el mismo elaborador. Sin embargo, se han encontrado diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la  $a_w$  de las cortezas del pan de molde, tanto industrial como artesanal, y barra, barra integral y pan candeal. Los resultados obtenidos de la predicción de crecimiento indican que *B. cereus* creció más rápido en las migas de los panes artesanales (0,191-0,194 h<sup>-1</sup>), mientras que la miga del pan candeal industrial presentó la velocidad de crecimiento más baja ( $\mu_{max}$  0,079 h<sup>-1</sup>). Este hecho indica que este pan podría considerarse el más seguro. Así mismo, se observó que una reducción de 0,5 unidades de pH provocó un descenso de  $\mu_{max}$  de 0,100 h<sup>-1</sup> en el crecimiento de este microorganismo. Finalmente, se propone el control del pH y de la  $a_w$  durante la elaboración del pan para evitar el crecimiento *B. cereus*.

## PALABRAS CLAVE

---

*Bacillus cereus*, características fisicoquímicas, pan, modelo de crecimiento.

## ABSTRACT

---

Bread is widely consumed as a part of traditional diet and is an important source of dietary energy. *B. cereus* spores can germinate at 5 to 55 °C and at  $a_w \geq 0,92$  and that could survive the baking process and germinated if the cooling is slow during the storage. The aim of this study was to know the growth parameters of *B. cereus* in several in breads from craft and industrial bakeries by determination pH,  $a_w$  and NaCl into crumb and crust. The growth of *B. cereus* in bread was predictive at minimum, mean and maximum pH and  $a_w$  values using the *ComBase* database. Water activity ( $a_w$ ) values were between 0,811-0,939, and 0,959-0,980 to the crust and the crumb, respectively. The pH values were between 5,56 to 5,82 and 5,54 to 6,05 to the crust and crumb, respectively. Non-significant differences were found between kinds of bread to the same producer. However, significant differences ( $p < 0,05$ ) have been found between the  $a_w$  of the crusts of sliced bread and loaf, wholemeal bread and candeal bread. The predictive model shown that *B. cereus* grew up faster in the crumbs from craft bakeries ( $0,191$ - $0,194 \text{ h}^{-1}$ ). Nevertheless, the crumb of industrial candeal bread showed lowest growth rate ( $\mu_{\max} 0,079 \text{ h}^{-1}$ ). This fact indicates that could be considered as safest bread. The reduction 0,5 units of pH in crumb bread it can reduced of  $\mu_{\max}$  at  $0,100 \text{ h}^{-1}$  to *B. cereus*. The pH and  $a_w$  control during the making process of bread could be used to prevent the growth of sporulated microorganisms such as *B. cereus*.

## KEY WORDS

---

*Bacillus cereus*, physical-chemical properties, bread, predictive modeling.

## TABLA DE ABREVIATURAS

---

**Tabla 1.** Tabla de abreviaturas

$a_w$	Actividad de agua
BAL	Bacterias ácido lácticas
HCO	Hidratos de carbono
NMP	Número más probable
np	Valor no presentado
OMS	Organización Mundial de la Salud
UFC	Unidades formadoras de colonias
s.s.s.	Sobre sustancia seca
TD	Tiempo de duplicación
$\lambda$	Tiempo de latencia
Tr	Trazas
$\mu_{max}$	Velocidad máxima de crecimiento

## ÍNDICE:

<b>1</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
2.1	El consumo de la harina de trigo y del pan .....	8
2.2	Definición y características de la harina.....	8
2.3	Usos de la harina y su implicación en el pan .....	10
2.4	Definición y características del pan.....	11
2.5	Elaboración general del pan.....	12
2.6	Composición físico-química del pan.....	12
2.7	Calidad nutricional del pan .....	13
2.8	Calidad microbiológica del pan .....	14
2.9	<i>Bacillus</i> spp. ....	17
<b>3</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
4.1	Toma de muestra .....	20
4.2	Plan experimental.....	20
4.3	Parámetros Físicoquímicos del pan .....	21
4.3.1	Composición nutricional .....	21
4.3.2	Actividad de agua .....	21
4.3.3	pH .....	22
4.3.4	NaCl.....	22
4.4	Modelos de crecimiento predictivo para <i>Bacillus cereus</i> .....	22
4.5	Análisis estadístico .....	23
<b>5</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
5.1	Parámetros Físicoquímicos del pan .....	24

5.1.1	Composición nutricional .....	24
5.1.2	Actividad de agua .....	25
5.1.3	pH .....	27
5.1.4	NaCl.....	28
5.2	Modelos de crecimiento predictivo para <i>Bacillus cereus</i> .....	29
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>39</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>45</b>
8.1	Anexo 1. Obtención de la harina .....	45
8.2	Anexo 2. Características físico-químicas del pan .....	46
8.3	Anexo 3. Composición nutricional de distintos tipos de pan .....	47
8.4	Anexo 4. Diseño experimental .....	50
8.5	Anexo 5. Preparación de NaCl.....	51
8.6	Anexo 6. Ingredientes de diversos panes en función del establecimiento elaborador.....	52
8.7	Anexo 7. Modelizaciones de crecimiento de <i>B. cereus</i> .....	53
8.8	Anexo 8. Datos de crecimiento de <i>B. cereus</i> bajo distintas condiciones de pH y $a_w$ .....	55

## 1 JUSTIFICACIÓN

---

Los cereales y sus productos derivados constituyen una parte fundamental de la dieta equilibrada, encontrándose en la base de la pirámide alimentaria de la Organización Mundial de la Salud (OMS). El cereal predominante en la dieta humana es el trigo (*Triticum*), y las variedades que más se cultivan son el trigo duro (*Triticum durum*) y el trigo blando (*Triticum aestivum*).

En España, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación ha estimado para 2018 un valor de producción en el sector de los cereales (excluyendo el arroz) de 4.278 millones de euros. La compra de cereales en los hogares españoles aumentó un 2,5% en 2018. El consumo per cápita de cereales en este año fue de 1,61 kg por persona y año (1). Analizando el consumo total de cereales de 2018/19, el consumo de trigo en alimentación humana supone un 95% del total de cereales (2).

A día de hoy, la principal forma de consumo de este cereal es la harina de trigo. A su vez, la harina de trigo es la materia prima básica para los alimentos del grupo de los cereales y derivados, como el pan o las pastas alimenticias, cuyo consumo diario recomendado se encuentra entre 4 y 6 raciones gracias a su contenido en fibra, minerales y vitaminas, además de ser el principal aporte de hidratos de carbono (HCO), que deben representar un 50-55% de las kcal totales de nuestra dieta. Las proteínas representan un 9,3% de la composición de la harina de trigo, y es en función de las propiedades funcionales de las proteínas por las cuales se clasifican para su uso en harinas panaderas, para pastas o para repostería.

Debido al elevado consumo de este grupo de alimentos, el control de la calidad tecnológica y microbiana es esencial para asegurar su adecuada seguridad alimentaria. La caracterización físico-química y reológica de las harinas es un aspecto clave para garantizar la calidad del trigo y de las harinas, así como para asegurar la obtención del producto esperado (3), que debe contar con unas propiedades organolépticas específicas atendiendo al color, sabor y olor, así como tener un nivel apropiado de humedad, un contenido adecuado de cenizas y ausencia de sustancias extrañas (4). La molienda de los granos del cereal compromete estas características, afectando también a la densidad aparente, al almidón dañado y a la estructura y propiedades funcionales de la harina (5).

## **2 INTRODUCCIÓN**

---

### **2.1 EL CONSUMO DE LA HARINA DE TRIGO Y DEL PAN**

Los cereales son el pilar fundamental de la alimentación en todo el mundo. Actualmente, de los 2,3 mil millones de toneladas de cereales producidas, 1 mil millones de toneladas son destinadas al consumo humano. Después del maíz y el arroz, la producción de trigo supone la tercera más importante del mundo, pero su consumo alimentario se sitúa en segundo lugar, siendo el arroz el principal (6).

El consumo de trigo evoluciona al ritmo al que lo hace el crecimiento poblacional. En la década de 1990 el crecimiento más lento de la demanda de cereales ocasionó una disminución en su consumo, ligado entre otros factores a la desaceleración del crecimiento de la población mundial. Sin embargo, el consumo ha ido paulatinamente en aumento desde entonces, llegando a superar la demanda a la producción en los países desarrollados en los últimos años (7). Es por ello que las importaciones, sobre todo de países en desarrollo, se han convertido en un aspecto fundamental para esta creciente demanda (6).

En España, la producción de cereales (excluyendo el arroz) representa el 8% de la Producción de la Rama Agraria y el 13% de la Producción de la Rama Vegetal. Esto supone un incremento en el valor de la producción respecto al año anterior, además de representar el valor más alto desde 2013 (8). En cuanto a la producción del trigo duro, las estimaciones de superficie cultivada de cereales de otoño-invierno para la campaña de comercialización 2018-19, cosecha 2018, reflejan un descenso del 7,6% en la superficie de producción para cereal. En 2018, la cosecha de trigo blando supuso 6,7 millones de toneladas, y la de trigo duro 1,32 millones de toneladas (9).

El consumo per cápita a finales de 2018 del pan fue de 31,87 kg/persona/año, que supuso un descenso del 2% respecto al año anterior. Sin embargo, para la harina este consumo aumentó respecto al de 2017, siendo en 2018 de 2,33 kg/persona/año (1).

### **2.2 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA HARINA**

La harina, de acuerdo al Real Decreto 677/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad para las harinas, las sémolas y otros productos de la molienda de los cereales, se define como “el producto obtenido de la molturación del grano del cereal, constituido fundamentalmente por el endospermo, con una granulometría tal que el 90% de sus partículas pase a través de un tamiz de 180 µm de

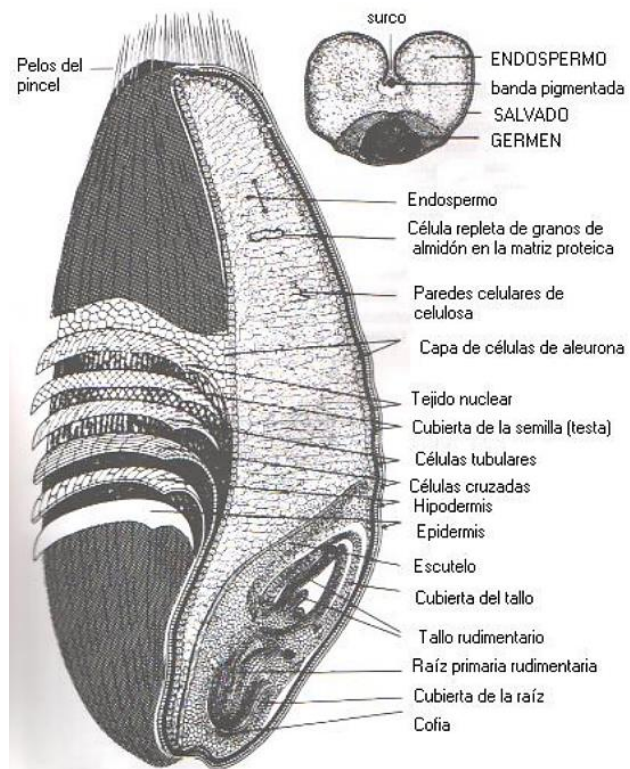


luz de malla, a excepción de la harina de trigo morena, que pasa el 80% de las partículas”.

Además, la normativa establece que la denominación de las harinas se acompañe por el nombre del cereal de procedencia de las mismas. De esta forma, podemos encontrar harina de trigo, de centeno, de cebada, de arroz o de avena, entre otros cereales. También se pueden elaborar harinas obtenidas de legumbres, como la harina de garbanzos o de soja; harinas obtenidas de frutos secos y de raíces o tallos, como la harina de tapioca o de fécula de patata. Otro tipo de harinas que se pueden encontrar son las de mezcla de harinas, resultado del mezclado de las harinas de diferentes cereales.

La denominación general de harina se corresponde con la harina de trigo, definida como aquella obtenida de la molturación del grano de trigo *Triticum aestivum* o la mezcla de este con el *Triticum durum* *desf.*, siempre que el contenido de esta última variedad no supere el 20% en la composición final del producto. La harina de trigo está descrita como lista para su venta al consumidor final o destinada para ser utilizada en la elaboración de otros productos alimenticios.

En los cereales podemos diferenciar tres partes: el germen, el endospermo y el salvado (Figura 1). El germen, que es la parte más interna que germina para crecer, contiene proteínas de alta calidad, lípidos, minerales y vitaminas del grupo B y vitamina E. El endospermo, que es la parte intermedia que envuelve al germen proporcionándole nutrientes para su desarrollo, es la fuente principal de HCO, aunque también contiene proteínas, minerales y vitaminas. El salvado, que es la parte más externa que compone la cubierta del cereal, es rico en fibra, minerales y vitaminas del grupo B. (10)



**Fig. 1.** Anatomía del grano de trigo, corte longitudinal y transversal  
Fuente: Ferreras, 2009 (60)

La harina blanca o refinada se elabora únicamente con la parte intermedia, con el endospermo, mientras que la harina

integral es la elaborada mediante la molturación de las tres partes del grano de cereal, por lo que su composición se corresponde con la del grano del cereal íntegro (11). Los métodos de obtención de la harina pueden verse en el Anexo 1.

### 2.3 USOS DE LA HARINA Y SU IMPLICACIÓN EN EL PAN

Los trigos duros, como *Triticum durum*, suelen tener un contenido mayor de proteínas (10-15%), y se destinan principalmente a la elaboración de harina para pan y la sémola que se obtiene se utiliza en la producción de pasta. Los trigos como *Triticum aestivum*, más blandos, se caracterizan por tener un menor contenido de proteínas (8-11%) y su uso se deriva a la producción de harina, salvado, galletas, pasteles y algunos tipos de pan (12) (13).

La calidad panadera de la harina de trigo se determina en función de las características que posea el trigo, y permite clasificar los tipos de harina según su fuerza. Por definición, la calidad panadera “es la calidad mínima exigible para el empleo de una harina en panificación, definida en función de su contenido en proteínas y su fuerza alveográfica”, según el BOE, Real Decreto 677/2016 (16 de diciembre) (11).

Las proteínas de la harina de trigo hacen que este cereal tenga la capacidad de formar una masa fuerte, cohesiva, capaz de retener gas y obtener un producto esponjoso tras el horneado. Concretamente, es el contenido y la calidad del gluten, lo que le confiere a la harina de trigo la capacidad de ser panificable. En base a esto, una harina con un alto contenido en gluten permitirá que la masa absorba más agua y fermente más lentamente, dando como resultado una masa elástica y consistente (14) (15). En función de esta capacidad la harina podrá destinarse a unos u otros usos, como podemos ver en la Tabla 2.

Para obtener la fuerza panadera se utiliza un alveógrafo, que es un equipo que permite medir las propiedades reológicas de la harina y representar los resultados de forma gráfica y numérica. El trabajo necesario para romper una lámina de masa de harina empujada por el aire es lo que se conoce como fuerza panadera o índice de capacidad panificable, representado mediante la letra “W” (14).

**Tabla 2.** Clasificación de las harinas de trigo en base a su índice de capacidad panificable

Tipo de harina	Proteína (% s.s.s.)	W Fuerza ( $\times 10^{-4}$ j)	Utilidad
<b>Gran fuerza</b>	$\geq 14,5$	$\geq 350$	Masas muy enriquecidas
<b>Fuerza</b>	$\geq 12,5$	$\geq 250$	Masas enriquecidas
<b>Media fuerza</b>	$\geq 10,5$	$\geq 150$	Pan tradicional
<b>Panificable</b>	$\geq 9$	$\geq 70$	Masas ligeras

Fuente: BOE, Real Decreto 677/2016 (16 de diciembre) (11)

## 2.4 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL PAN

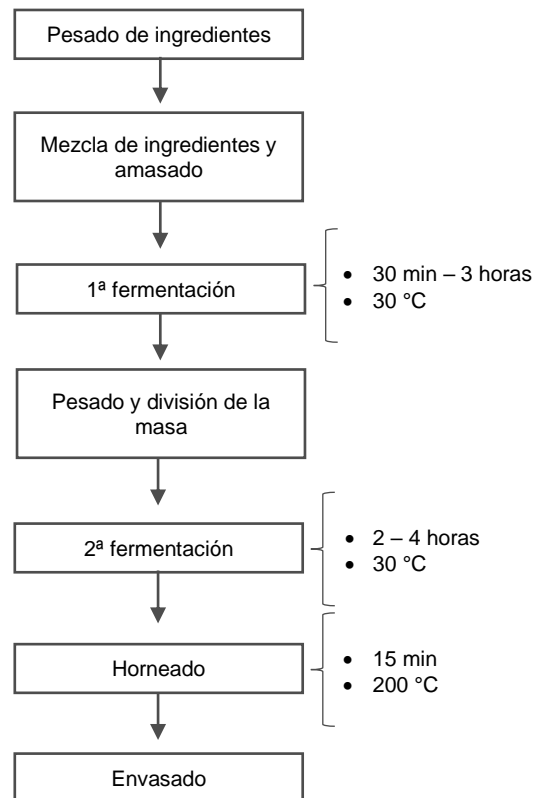
El pan, de acuerdo con el Real Decreto 308/2019, de 26 de abril, por el que se aprueba la norma de calidad para el pan, “es el producto resultante de la cocción de una masa obtenida por la mezcla de harina y agua, con o sin adición de sal, fermentada con la ayuda de levadura de panificación o masa madre”.

Además de los ingredientes mencionados, se pueden adicionar otros que proporcionan diversas variedades de pan al mercado. Dependiendo de la zona de elaboración, la forma del pan, su peso o modo de producción también se han establecido diferentes denominaciones para el pan.

El pan común es aquel cuyo consumo habitual se efectúa en las veinticuatro horas siguientes a su producción, ya sea elaborado con harina refinada o integral, con o sin salvado de cereales en su composición. El pan común puede recibir diferentes denominaciones en función, como se ha mencionado anteriormente, de su forma de elaboración o ingredientes. El pan bregado, de miga dura, español o candeal es aquel cuya preparación precisa del uso de cilindros refinadores, tradicional de algunas zonas de España y elaborado con harina de *Triticum durum*. El pan integral es aquel elaborado con harina integral o de grano entero, y gracias a la nueva normativa de 2019 en España se establecen las normas por las cuales denominar a esta variedad de producto. De esta forma, aquellos panes elaborados con harina integral en su totalidad se podrá acotar su nombre con el de “pan integral” acompañado del nombre del cereal o cereales de los cuales procedan la harina o las harinas utilizadas. Sin embargo, aquellos panes en cuya composición se incluyan otras harinas o sémolas integrales deberán incluirse denominando el cereal o sémola correspondiente acompañado del porcentaje que corresponda a la composición final del pan elaborado (BOE, Real Decreto 308/2019 (26 de abril)) (16).

## 2.5 ELABORACIÓN GENERAL DEL PAN

La elaboración de pan de forma tradicional consta de varias etapas. En primer lugar, se realiza el amasado mediante el cual se mezclan homogéneamente los ingredientes mencionados hasta que se forme una masa flexible y elástica. A continuación, se deja reposar la masa para que se produzca la primera fermentación, doblando su volumen. Tras este tiempo de espera se divide la masa en piezas uniformes y, de nuevo, se deja reposar para que vuelva a doblar su volumen, coincidiendo esta etapa con la segunda fermentación. Finalmente, se cocina en un horno en torno a 200 °C durante 15 minutos. En la Figura 2 se puede ver un diagrama de flujo sobre la elaboración general del pan.



**Fig. 2.** Diagrama de flujo sobre la elaboración general del pan. *Elaboración propia*

## 2.6 COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL PAN

El pan blanco elaborado con harina de trigo es rico en HCO complejos, suponen alrededor de un 58% de su composición, y principalmente debida a la fracción de almidón, que supone el aporte energético de este producto. Los HCO de rápida absorción o sencillos se encuentran en bajas proporciones. El contenido proteico se encuentra en torno a un 7,8% y su aporte en materia grasa es minoritario. Comparando su composición con la del pan integral (Tabla 3, Anexo 2) podemos ver que el contenido en fibra es mucho menor en el pan blanco que en el integral. Sin embargo, el contenido en cenizas del pan blanco supera el del pan integral.

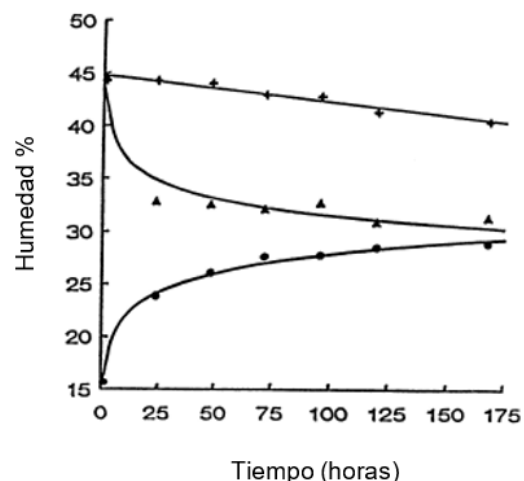
Lo más característico es que el pan blanco es un producto con alto contenido de humedad, que es un factor de riesgo para el crecimiento de patógenos. Su  $a_w > 0,93$  crea un medio apto para el crecimiento de bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas y de hongos que podrían ser micotoxigénicos.

La norma del Real Decreto 1137/1984, de 28 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Fabricación, Circulación y Comercio del Pan y Panes Especiales, a pesar de quedar derogada en la actualidad, es la que determinaba el contenido máximo de humedad del pan como producto terminado. En

ella se establecía la humedad del pan especial, que debía ser como máximo del 38% (17). Este es el caso del pan de molde, y debido a su elevada humedad su actividad de agua también aumenta, siendo este producto especialmente susceptible a la infección por mohos.

Los principales problemas relacionados con el deterioro físico de los productos de panadería son los cambios en su contenido en humedad, que afectan aumentando o disminuyendo en productos con humedad baja e intermedia. Para solventarlo la industria ha innovado envoltorios para sus productos, pero estos recubrimientos pueden generar un ambiente propicio para el crecimiento de mohos, sobre todo en productos horneados de alta humedad como el pan.

La redistribución de la humedad de la miga a la corteza es uno de los problemas de deterioro físico más graves que se produce tras la cocción de los productos de panadería (18), y se ha sugerido como el principal mecanismo responsable del endurecimiento de estos productos. En la Figura 3 se muestra el cambio en el contenido de humedad en distintas zonas del pan durante el almacenamiento. Pero este no es el único cambio que sucede tras la cocción de estos alimentos, también se produce una retrogradación del almidón, aumenta la firmeza y se produce una pérdida de aroma y sabor en el producto (19).



**Fig. 3.** Cambios en el contenido de humedad en la corteza (●), en el centro de la miga (+) y en zonas cerca de la corteza (▲) en 100 g de harina de pan almacenada durante 168 horas. Fuente: Czuchajowska et al., 1989 (18)

En cuanto a los problemas por deterioro químico se encuentra la rancidez, que ocurre en los productos de panadería con mayor contenido de grasa, como el pan de molde. La rancidez es provocada por la degradación de lípidos, ocasionando malos olores y sabores en el producto. Existen dos tipos de rancidez: la rancidez oxidativa y la rancidez hidrolítica. La primera se produce por la descomposición de los ácidos grasos insaturados en presencia de oxígeno, mientras que la segunda ocurre en ausencia de oxígeno y es ocasionada por la hidrólisis de los triglicéridos (20).

## 2.7 CALIDAD NUTRICIONAL DEL PAN

En la Tabla 4, 5 y 6 (Anexo 3) se puede ver la composición nutricional del pan blanco, del pan integral y del pan blanco de molde, respectivamente. A grandes rasgos se puede observar que el pan de molde es el que más energía aporta de los tres y también el que

mayor contenido lipídico presenta. El pan integral es el que más aporte de fibra contiene, destacando también por presentar mayores niveles de magnesio y ácido fólico.

En el pan elaborado con harina de trigo, el contenido en minerales como selenio, fósforo, potasio y zinc y vitaminas es limitado, presentando pequeñas cantidades de algunas vitaminas del grupo B (21).

Atendiendo a la composición de la miga, encontramos que su cantidad de almidón de rápida absorción es superior ( $91,73 \pm 0,21$  g de fracción de almidón/100 g de almidón en la miga de panes con alta humedad frente a  $87,63 \pm 1,76$  g de fracción de almidón/100 g de almidón en la corteza del mismo tipo de panes) (22), y es este componente el que se ha asociado con peores efectos en la salud, relacionado con enfermedades como la obesidad, las enfermedades cardiovasculares o la diabetes tipo II (23). Es por ello que la investigación en este sector está centrando su atención en el enriquecimiento del pan y los productos horneados con ingredientes vegetales de alto valor nutricional como harinas de leguminosas o derivados de semillas oleaginosas. De esta manera, el valor proteico, lipídico y de compuestos antioxidantes y fitoquímicos de los productos horneados se incrementaría. Sin embargo, estos ingredientes podrían hacer que la calidad organoléptica de estos alimentos se viera comprometida, y es por ello que la investigación en este campo debe seguir avanzando para que el resultado del enriquecimiento de estos productos sea óptimo en todos los aspectos señalados (24).

## **2.8 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL PAN**

El deterioro físico-químico y microbiológico hace que la vida útil de los productos de panadería se vea limitada, pero debido a la alta humedad que el pan presenta ( $a_w=0,949$ ) también se ve implicado el impacto sanitario sobre los usuarios que lo consumen. Es por ello que la calidad microbiológica es uno de los principales focos a los que prestar atención en cuanto a la calidad higiénica de este producto, pues compromete su seguridad alimentaria.

Los productos horneados con alto contenido de humedad como el pan son un medio adecuado para el crecimiento de bacterias, levaduras y mohos. Además, también pueden estar presentes otros microorganismos en la materia prima, como la harina de trigo antes del horneado (20). A pesar de que la harina tiene una actividad de agua baja ( $a_w=0,523$ ) (11) (25) donde el crecimiento de microorganismos se ve limitado, las bacterias y los mohos pueden contaminarla y sobrevivir largos periodos de tiempo en ella. Asimismo, la baja humedad de la harina hace que aumente la resistencia a las altas temperaturas de algunos microorganismos durante el horneado (26). Si a lo anterior añadimos que no se alcance una temperatura óptima durante la cocción del producto o

que exista una contaminación cruzada posterior al horneado del producto, podríamos encontrar la presencia de microorganismos patógenos en el producto final, comprometiendo su calidad higiénica.

El principal problema bacteriano que podemos encontrar es el causado por *Bacillus subtilis*, una bacteria del género *Bacillus* formadora de esporas que se encuentra en las materias primas de los productos molidos con bajo contenido de humedad. Además, las esporas de esta bacteria son capaces de sobrevivir a las temperaturas de horneado, germina cuando el producto se enfría y puede crecer en la etapa de envasado, tanto en un medio aerobio como anaerobio (20). Otras bacterias que pueden estar presentes en la materia prima y que pueden encontrarse en el producto final como se ha mencionado son *Salmonella*, *Escherichia coli* (0,8 log NMP/g), *Bacillus cereus*, o anaerobios sulfito-reductores, como *Clostridium perfringens* (<2 UFC/g). Cabe destacar que Cardoso et al. (27) y Eglezos (28) no encontraron presencia de *Salmonella* ni de *B. cereus* en las muestras que analizaron.

Los problemas causados por el crecimiento de levaduras se distinguen por su crecimiento en la superficie de los productos, que adquieren coloraciones blancas o rosadas visibles, sobre todo, en productos con alta actividad de agua y con una vida útil corta. Las principales levaduras que causan los problemas de deterioro en estos productos son *Pichia burtonii*, de la familia de *Saccharomycetaceae*, y en menor medida *Candida guilliermondii*, *Hansenula anomala* y *Debaromyces hansenii*. Las levaduras crecen a  $a_w$  superiores a 0,88, por lo que el pan podría ser un medio apto para su crecimiento al encontrarse en valores de este parámetro superiores a 0,91. Así mismo, la temperatura de almacenamiento del pan es adecuada para el crecimiento de esta flora, pues el rango de temperatura para su crecimiento es de 5 a 37 °C (20).

Muchos mohos pueden crecer a valores de actividad de agua superiores a 0,8, lo cual incluye, como ya se ha comentado, al pan y otros productos de repostería. Especialmente el pan de molde que tiene una humedad superior y, por lo tanto, una actividad de agua ( $a_w=0,965$ ) más alta que la del pan blanco, es uno de los productos en los que mayores niveles de crecimiento de mohos se pueden encontrar (18). Estos productos cuando son recién horneados carecen de mohos viables y de sus esporas, pero pueden contaminarse en el medio exterior tras su horneado al estar expuestos a esporas de mohos presentes en el aire, superficies, equipos de panadería, ingredientes crudos o manipuladores de alimentos que actúen como vectores. Esto se hace más evidente cuando las condiciones de almacenamiento tras el horneado son más cálidas y húmedas, como, por ejemplo, en los meses de verano (20).

También debe señalarse la posible contaminación por micotoxinas presentes en la harina, siendo uno de los problemas más graves que afectarían a la seguridad y la calidad del producto final, pues pueden transferirse de los granos de cereales a los productos ya procesados. Las micotoxinas son metabolitos fúngicos tóxicos que al ser ingeridos provocan una intoxicación o micotoxicosis, ya sea aguda si se ha consumido una dosis elevada en una sola ocasión que ha desencadenado el cuadro clínico; o una intoxicación crónica si se han ingerido alimentos contaminados en dosis repetidas durante un largo tiempo. Estos metabolitos causan alteraciones hepáticas, renales, nerviosas, digestivas, circulatorias, endocrinas, etc. Las más importantes y más frecuentemente encontradas son las aflatoxinas y la ocratoxina A, producidas por varias especies de los géneros *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. (20) (27).

Estos microorganismos son algunos de los patógenos que pueden encontrarse en el pan, bien por el paso del tiempo, por contaminación cruzada o por un mal manejo del producto. Sin embargo, no son los únicos y no siempre la presencia microbiana en los alimentos, y en concreto, en el pan supone un deterioro del producto. Existen microorganismos beneficiosos presentes intencionadamente o no en el pan que ayudan a mejorar sus cualidades. Por ejemplo, la levadura de panadería más usada y conocida es *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura utiliza como fuentes de carbohidratos preferidas la glucosa y la fructosa presentes en la masa panadera, aunque también es capaz de degradar otros azúcares (30). La degradación de estos compuestos hace que se genere alcohol y CO<sub>2</sub>, ambos eliminados en el horneado, y es lo que se conoce como fermentación. También pueden agregarse bacterias ácido lácticas (BAL) para la elaboración de pan de masa ácida. Los principales beneficios que ofrecen estas bacterias son el retraso del endurecimiento del pan (31) y la inhibición del crecimiento de patógenos como *Bacillus* spp., entre otros, permitiendo el incremento del tiempo de vida útil del producto sin la adición de conservantes (20) (32). Las condiciones necesarias para el crecimiento de estos microorganismos beneficiosos se muestran en la Tabla 7, y en la Tabla 8 se pueden observar las condiciones para el crecimiento de algunos de los patógenos que podemos encontrar en el pan.

**Tabla 7.** Condiciones necesarias para el crecimiento de microorganismos beneficiosos

Rango de crecimiento				
Microorganismo	Temperatura °C	pH	a <sub>w</sub> mín.	Condiciones gaseosas
<i>Lactobacillus</i> spp.	10-45	4,5-6,2	0,92	Aerobio facultativo
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18-38*	4,5-6,5	0,9	Aerobio facultativo

\*Temperatura de fermentación

Fuente: Olivera, 2011 (33), Suárez et al., 2016 (34), Fontana, 2008 (35)



**Tabla 8.** Condiciones limitantes para el crecimiento de microorganismos patógenos

Mínimo requerido				
Microorganismo	Temperatura °C	pH	a <sub>w</sub>	Condiciones gaseosas
<i>Aspergillus spp.</i>	25	2,1	0,85	Aerobio
<i>B. cereus</i>	5	4,35	0,91	Anaerobio facultativo
<i>C. botulinum</i>	6,7	4,8	0,96	Anaerobio
<i>C. perfringens</i>	15	5	0,95	Aerobio facultativo
<i>E. coli</i>	7	4,4	0,95	Aerobio facultativo
<i>L. monocytogenes</i>	0	4,3	0,92	Aerobio facultativo
<i>Penicillium spp.</i>	5	2	0,8	Aerobio facultativo
<i>Pichia burtonii</i>	5	2,8	0,9	Aerobio
<i>Salmonella spp.</i>	6	4	0,94	Aerobio facultativo
<i>S. aureus</i>	6	4,5	0,86	Aerobio facultativo
<i>V. parahaemolyticus</i>	5	4,8	0,94	Aerobio facultativo

Fuente: Smith et al., 2004 (20), Wheeler et al., 1991 (36), Legan et al., 1991 (37) y Kramer et al., 1989 (38)

## 2.9 BACILLUS SPP.

Las bacterias pertenecientes al grupo *Bacillus* spp. se caracterizan por ser anaerobias facultativas productoras de esporas que pueden provocar toxiinfecciones alimentarias en el ser humano. Pueden estar distribuidas en el agua, el suelo y la vegetación, por lo que fácilmente pueden contaminar cualquier alimento de origen ganadero o agrícola (39). En la mayoría de los casos las toxiinfecciones alimentarias asociadas a este grupo de bacterias son causadas por *B. cereus*, que puede causar dos tipos de intoxicaciones: la forma diarreica, ocasionada por la ingestión de esporas bacterianas que producen enterotoxinas en el intestino; y la forma emética, asociada a la ingestión de una toxina preformada en el alimento (40). Sin embargo, existen otras especies en el género *Bacillus* que no están asociadas tan frecuentemente a toxiinfecciones, como *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*.

La incidencia de deterioro en pan de trigo causado por especies de *Bacillus* ha aumentado en los últimos años debido a la eliminación de conservantes adicionados al pan en su elaboración y a que suelen añadirse materias primas en su elaboración como salvado o semillas. Estas materias primas fueron a partir de donde comenzó a documentarse la contaminación por *Bacillus*, así como harinas, productos de panadería y superficies de trabajo contaminadas (41).

La mayoría de los casos de intoxicación alimentaria por *B. cereus* están asociadas a una contaminación de 5 a 8 log UFC por gramo de alimento contaminado, aunque en

algunos casos se han visto asociados a concentraciones menores, entre 3 y 4 log UFC por gramo. Las toxiinfecciones causadas por otras especies de *Bacillus* están siempre asociadas a una ingestión mayor de células o esporas en alimentos contaminados, por encima de 6 log UFC por gramo (42).

La mayoría de los brotes asociados a *B. cereus* están relacionados con restaurantes tipo catering o bufet (34,6% de los brotes), mientras que la segunda causa más frecuente de brotes está asociada a productos de cereales contaminados (26,9% de los brotes) (43). En general, los casos de intoxicación alimentaria por *B. cereus* no se informan debido a que los efectos asociados tienen una corta duración, suelen ser leves y autolimitados y no desencadenan grandes brotes, aunque sí se han registrado algunos casos fatales (39) (40).

Las esporas de las bacterias de este grupo resisten altas temperaturas y no son eliminadas con un tratamiento térmico normal. Estas esporas pueden germinar y multiplicarse en alimentos con alta humedad y poco ácidos, a temperaturas desde 4 o 5 °C hasta 55 °C (38) (42). Debido a estas propiedades de supervivencia, se pueden encontrar un número elevado de esporas de *B. cereus* en alimentos como las especias, los cereales, las verduras y los productos procesados (39). En el caso del pan elaborado por un proceso de cocción parcial, en el cual la temperatura en el centro de la masa no supera en ningún momento los 100 °C, las esporas son capaces de sobrevivir y gracias a que el pan terminado tiene una  $a_w$  de 0,96 se favorece el crecimiento de *B. cereus* (44).

Las temperaturas de refrigeración reducen el crecimiento de *B. cereus* al aumentar tanto el tiempo de generación como el tiempo de latencia. En cuanto al pH, se ha visto que la tasa de crecimiento a 25 °C de una cepa de *B. cereus* es constante entre pH 7 y pH 5,5; sin embargo, por debajo de este nivel la tasa de crecimiento cae drásticamente. La  $a_w$  mínima requerida por *B. cereus* es de 0,92, aunque en algunos casos puede crecer a una  $a_w$  de 0,91. Respecto a la concentración de cloruro de sodio (NaCl) relacionada con el crecimiento de *B. cereus* no hay datos consistentes, aunque parece que concentraciones superiores a 7% de NaCl no permiten el crecimiento de esta bacteria a ninguna temperatura (42).

En el caso de las esporas de *B. cereus*, el calor normalmente utilizado para eliminar otras esporas bacterianas no resulta efectivo, pues en este caso las esporas tienen un amplio rango de resistencia al calor tolerando procesos habituales de cocción o pasteurización. Sin embargo, esta resistencia puede modificarse reduciendo el pH del

medio. Por ejemplo, Fernández et al. (45) mostraron que a 95 °C la supervivencia de las esporas de *B. cereus* disminuyó tres veces cuando se disminuyó el pH de 6,2 a 4,7.

Una de las principales causas de deterioro en productos como el pan, después del enmohecimiento, es el “deterioro de la cuerda” o “ropy spoilage”. Es debido a la producción, por parte de especies *Bacillus*, de amilasa extracelular que dan como resultado al pan una textura viscosa. En este fenómeno hay un predominio de contaminación por *B. subtilis* por su mayor resistencia al proceso de cocción (46), aunque también están asociados *B. licheniformis*, *B. cereus* y *B. mesentericus* (41). Además, la viscosidad en el pan también está asociada a la contaminación por esporas en materias primas cada vez más usadas en la elaboración de este producto, como salvado, granos y semillas (46).

El pan deteriorado por viscosidad se caracteriza por tener un olor dulce a fruta similar a melón, con una miga de aspecto descolorido, pegajosa, pastosa y fibrosa si la degradación sigue avanzando. Este hecho puede advertirse tras 12-24 horas después de haberse completado la cocción del pan, y el pan de trigo envasado tipo pan de molde es el más susceptible a esta degradación. Es más común en áreas geográficas cálidas y húmedas, pues en estas condiciones se favorece el crecimiento de *Bacillus* (41).

Las principales medidas de control para evitar la contaminación por bacterias del género *Bacillus* se basan en el control de la temperatura y en el establecimiento de un sistema de autocontrol basado en el Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) a lo largo de toda la cadena alimentara. Debido a que los tratamientos térmicos como cocción y pasteurización no son suficientes para eliminar las esporas de *B. cereus*, es necesario someter a los productos alimentarios a temperaturas superiores a 105 °C (esterilización) (42). Además, la adición de conservantes químicos como ácido propiónico, propionato de calcio, ácido acético y calcio fosfato de hidrógeno son eficaces para la conservación de los productos de panadería y para evitar el crecimiento de este tipo de patógenos (41).

### 3 OBJETIVO

---

El objetivo general de este trabajo es conocer y valorar los factores de crecimiento de microorganismos patógenos, como *B. cereus*, en diversos panes elaborados artesanal e industrialmente.

Los objetivos específicos planteados son:

- Estudiar los factores intrínsecos de crecimiento microbiano presentes en miga y corteza de distintos tipos de panes de origen artesanal y de origen industrial.
- Realizar la modelización del crecimiento de *B. cereus* a través de los factores intrínsecos obtenidos de diversos tipos de panes.
- Realizar la modelización del crecimiento de *B. cereus* en un constructo obtenido de la combinación de los factores intrínsecos posibles.
- Establecer las diferencias entre los panes artesanales e industriales sobre los parámetros de crecimiento de *B. cereus* obtenidos de las modelizaciones.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 4.1 TOMA DE MUESTRA

Se recogieron las muestras de cuatro tipos de panes: barra de pan blanco, barra de pan integral, pan candeal y pan de molde. Los panes se obtuvieron de cuatro establecimientos diferentes en Valladolid: dos panaderías locales (establecimientos artesanales) y dos supermercados (establecimientos industriales). Esta operación se realizó por duplicado, en dos días alternos para cada uno de los establecimientos y tipos de panes. El diseño experimental que se siguió para la toma de muestra puede verse en la Tabla 9 (Anexo 4).

La recogida de las muestras en los establecimientos se realizó a primera hora de la mañana y se transportaron al laboratorio recubriendo las barras de pan con un sobre de papel y una bolsa de plástico para evitar tocarlas.

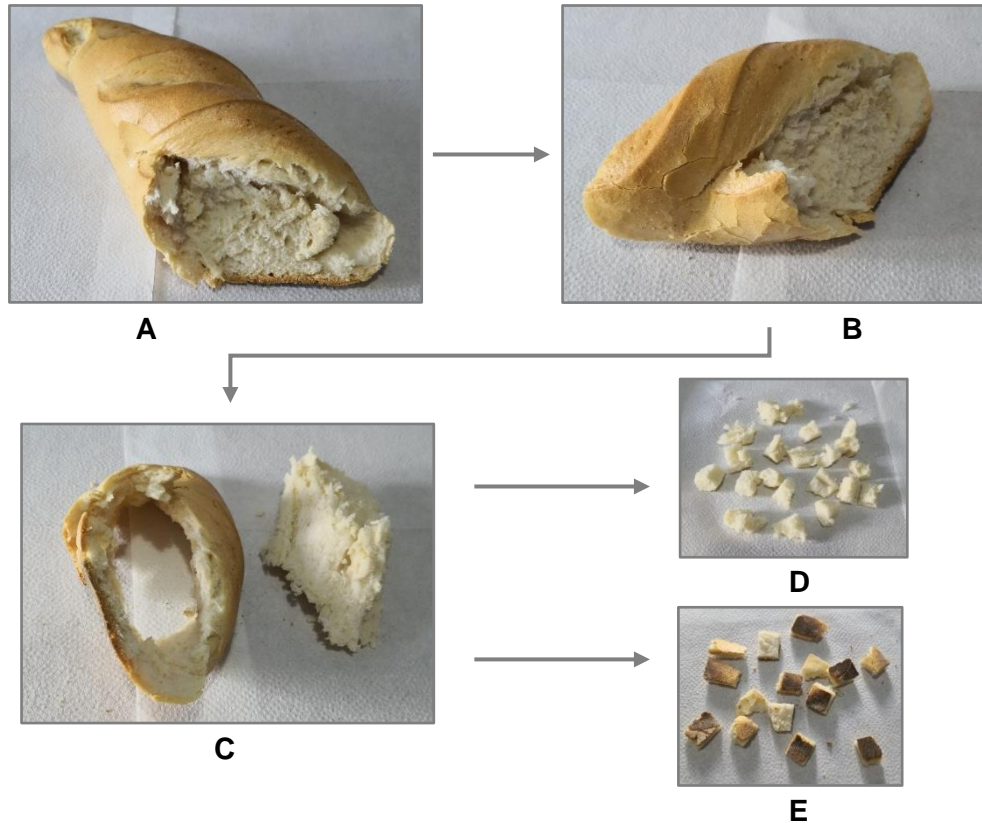
### 4.2 PLAN EXPERIMENTAL

Tras recepcionar los panes, se separaron por un lado la miga y por otro la corteza con la ayuda de un cuchillo. De esta manera se obtuvo la muestra de la corteza con un ancho de  $1\text{ cm} \pm 0,1\text{ cm}$ , y otra muestra para la miga. Tras la separación de corteza y miga, ambas partes se cortaron con ayuda de unas tijeras en porciones de aproximadamente  $2\text{ cm}^2$ . Este proceso puede verse en la Figura 4.

A continuación, se pesaron 100 g de cada muestra y se almacenaron a temperatura de refrigeración en bolsas herméticas y dentro de cajas de porexpan isotérmicas, para evitar pérdida de humedad. El análisis de  $a_w$  y pH se realizó dentro de las primeras 48 horas tras su recogida.

La reducción del tamaño de partícula de la miga y la corteza de los panes se realizó por separado, en un procesador de alimentos durante un minuto. Además, en el caso

de la corteza se realizó una segunda reducción de tamaño con otro procesador de alimentos, este proceso se llevó a cabo durante 1 minuto. El pH y la  $a_w$  se analizaron inmediatamente después de la reducción de tamaño de la partícula de las muestras. La determinación de NaCl se llevó a cabo tras la congelación de las muestras.



**Fig. 4.** Proceso de separación de corteza y miga en panes. **A:** corte longitudinal del pan. **B:** reducción de tamaño. **C:** separación de corteza y miga. **D:** reducción y homogeneización de tamaño de la miga. **E:** reducción y homogeneización de tamaño de la corteza. Elaboración propia

### 4.3 PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DEL PAN

#### 4.3.1 Composición nutricional

La composición nutricional de los panes industriales se obtuvo en unos casos a través del etiquetado y en otros utilizando la ficha técnica del producto facilitada por el fabricante. En cambio, para los establecimientos artesanales se recogieron únicamente los ingredientes con los que se elaboraron los panes, la composición nutricional de sus productos no estaba determinada.

#### 4.3.2 Actividad de agua

Inmediatamente después de la reducción de tamaño de partículas de la muestra, se pesaron 5 g de cada una de ellas y se depositaron en cápsulas de medida, las cuales se taparon herméticamente hasta su medición. Para su medición se empleó un aparato Aqualab CX-2 (Decagon Devices, Inc.). Las medidas se realizaron por duplicado y a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C).

#### 4.3.3 pH

Se mezclaron 5 g de cada muestra, previamente molida, con 20 mL de agua destilada, que se mantuvieron durante 5 minutos para la posterior determinación del pH (27). Para su medición se empleó un potenciómetro digital (Crisol, modelo GLP 22) conectado a un electrodo de pH (Crisol, modelo 52 31). Las medidas se realizaron por duplicado a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C).

#### 4.3.4 NaCl

La determinación de NaCl se llevó a cabo mediante el método Volhard a través de una valoración potenciométrica, siguiendo las indicaciones de la norma ISO 1841-2 (47) que se adaptó para la medida de este compuesto en panes y que se describe a continuación. Se pesaron aproximadamente 5 g±0,01g de la muestra en un vaso de precipitado en una balanza de precisión (Baxtran, ACM), se agregaron 45 mL de agua destilada y se homogeneizaron durante 1 minuto en un homogeneizador (Ultra turrax t-25). Una vez homogenizada la muestra se centrifugaron con ayuda de una centrifuga (Eppendorf) a 2000 r.p.m durante 2 min. 25 mL del sobrenadante se depositaron en un vaso de precipitado y se agregaron 25 mL de ácido nítrico al 2% (Sigma) para acidificar la muestra. La mezcla se tituló con ayuda de un titulador automático (Metrohm, 719 S Tritino) y un electrodo selectivo de cloruros. Previamente se realizó una curva de calibración, como se describe en el Anexo 5.

Las muestras se homogeneizaron y se analizaron en las primeras 24 h. Se procuró que la temperatura del material muestreado no sobrepasase los 25 °C.

Para el cálculo de la concentración de NaCl se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{V \text{ AgNO}_3 \times C \text{ AgNO}_3 \times 1\text{L}/1000\text{mL} \times Pm \text{ NaCl}}{V \text{ suspensión}}$$

Donde  $V \text{ AgNO}_3$  es el volumen de nitrato de plata utilizado,  $C \text{ AgNO}_3$  es la concentración de nitrato de plata (0,1 mol/ L  $\text{AgNO}_3$ ),  $Pm \text{ NaCl}$  es el peso molecular del cloruro de sodio (58,44 g/mol) y  $V \text{ suspensión}$  es el volumen utilizado de la suspensión (10 mL).

### 4.4 MODELOS DE CRECIMIENTO PREDICTIVO PARA *BACILLUS CEREUS*

Tras el tratamiento de los datos de  $a_w$ , pH y NaCl para obtener sus medias y DS, se utilizó un software de predicción de crecimiento e inactivación bacteriano on-line; ComBase Predictor (<https://browser.combase.cc/>). Este programa permitió realizar modelizaciones de crecimiento de *B. cereus* en las condiciones de pH y  $a_w$  encontradas en la miga de los panes analizados: barra, barra integral, pan candeal y pan de molde.

Además, se realizó un constructo de datos utilizando pH mínimo, pH medio, pH máximo,  $a_w$  mínima,  $a_w$  media,  $a_w$  máxima y sus posibles combinaciones para simular unas condiciones que podríamos encontrar en el pan.

Se modelizó el crecimiento de *B. cereus* con los valores de pH y  $a_w$  de las migas de todos los panes. Sin embargo, en la corteza únicamente se llevó a cabo la modelización con los valores obtenidos de pH y  $a_w$  para el crecimiento del mencionado microorganismo para el pan de molde, debido a que el software de predicción de crecimiento no permite valores más bajos. Las modelizaciones se realizaron de dos formas, tanto con los valores individuales de pH y  $a_w$  obtenidos de cada pan para obtener las medias de velocidad máxima de crecimiento y de tasa de generación, como las medias de pH y  $a_w$  de los panes artesanales e industriales.

Para la comparación de los datos de los panes elaborados artesanal e industrialmente se utilizaron distintas condiciones en función de los valores de pH y  $a_w$  obtenidos de cada pan. Se crearon 4 condiciones distintas que se repitieron por tipo de pan y por tipo de establecimiento. Para la primera condición se utilizaron: pH y  $a_w$  mínimos, pH y  $a_w$  medios y pH y  $a_w$  máximos (condiciones A y B). Para la segunda condición se fijó la  $a_w$  media y se modificaron los datos de pH mínimo, pH medio y pH máximo (condiciones C y D). Para la tercera condición se fijó el pH medio y se modificaron los datos de  $a_w$  mínima,  $a_w$  media y  $a_w$  máxima (condiciones E y F). Para la cuarta condición se utilizaron pH máximo y  $a_w$  mínima, pH medio y  $a_w$  media, y pH mínimo y  $a_w$  máxima (condiciones G y H). Además, se elaboró un modelo de crecimiento de *B. cereus* en condiciones de pH y  $a_w$  ideales, a fin de comparar el crecimiento bajo las condiciones seleccionadas con este modelo.

El tiempo de predicción para las barras normales, barras integrales y pan candeal fue de 72 horas. Para el pan de molde, el tiempo de predicción seleccionado fueron 288 horas, es decir, 12 días, debido a que este es el tiempo de vida útil para esta variedad (48).

#### **4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados obtenidos se introdujeron de forma manual en el programa Excel (*Office 2016*) para obtener la media, desviación estándar y nivel de confianza de los parámetros estudiados. El nivel de confianza se utilizaría para el cálculo de intervalos de confianza con un nivel de significación de 0,01 ( $\alpha=0,01$ ). Además, en los casos en los que se debían conocer las diferencias estadísticas entre los diversos parámetros de los panes, se utilizó un *software* on-line (<https://www.graphpad.com/>) para la determinación del valor *p* a través de la prueba de significación estadística *t-Student*.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 5.1 PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DEL PAN

#### 5.1.1 Composición nutricional

En la Tabla 10 se muestra la composición nutricional (por cada 100 g de producto) de los distintos panes, obtenida a partir de las etiquetas o de las fichas técnicas aportadas por el fabricante. El contenido calórico entre los diversos tipos de panes fue muy similar, cuyos valores oscilaron entre 254 y 270 Kcal. Estos valores fueron ligeramente superiores a los encontrados por Carocho et al. (49). La posible diferencia entre los valores obtenidos de este estudio y el anterior puede deberse a que esos autores estudiaron únicamente la barra integral.

La barra fue el pan que presentó mayor cantidad de HCO ( $54,70\% \pm 0,99$ ), y también fue el pan el que mostró la menor cantidad de fibra (2,9%). Como era de esperar, la barra integral fue la que mayor cantidad de fibra contenía ( $5,45\% \pm 0,35$ ). Estos resultados fueron superiores a los observados por Carocho et al. (49) quienes encontraron un valor de 3,3% de este componente en el mismo tipo de pan. Respecto al contenido de fibra en la barra los valores encontrados en este estudio (2,9% de fibra) fueron inferiores a los encontrados por diversos autores (50) y (51), quienes encontraron valores superiores en el pan blanco (barra) (3,79% y 6,96%, respectivamente).

El pan de molde fue el que mayor cantidad de proteínas mostró  $10,2\% \pm 0,99$ , en comparación con los otros tipos panes estudiados en este trabajo. La legislación alimentaria, según el BOE, Real Decreto 308/2019 (26 de abril) (16), establece los ingredientes que pueden agregarse a los panes especiales, como el pan de molde, sin establecer un límite de adición. Entre ellos se encuentran gluten de trigo, diversos tipos de leche (entera, condensada, en polvo, etc.), huevos y ovoproductos, grasas y aceites comestibles, etc. La diferencia encontrada en el alto contenido proteico y materia grasa del pan de molde analizado puede deberse a la adición de estos ingredientes en su elaboración, tal como se indica en la Tabla 11 (Anexo 6). Si comparamos los valores de proteínas recogidos en las etiquetas de la barra integral ( $8,6\% \pm 0,28$ ) entre este estudio y la bibliografía encontramos que estos valores son superiores a los obtenidos por Carocho et al. (49), quienes observaron un contenido de proteínas de 6,55%, e inferiores a los obtenidos por Sanz et al. (50) y por Miranda et al. (51), quienes encontraron valores de proteínas de 14,29% y 16,5%, respectivamente.

El contenido de materia grasa es ligeramente superior (0,7-1,2 g/100g de pan) en el pan de molde en comparación con los otros tipos de panes. Estos valores fueron



superiores a los encontrados en la bibliografía (49, 50 y 51). Carochó et al. (49) encontraron un contenido lipídico de 0,18% en pan integral, Sanz et al. (50) observaron un 0,69% de materia grasa en pan blanco (barra) mientras que Miranda et al. (51) mostraron un 0,07% de contenido graso en pan blanco (barra). La diferencia entre este estudio y los estudios antes mencionados es que esos autores analizaron barra y no pan de molde, que es un pan especial al que se agrega materia grasa (BOE, Real Decreto 308/2019 (26 de abril) (16).

Finalmente, el contenido de cloruro de sodio osciló entre 1,19 y 1,7 g/100 g de pan, siendo la barra integral la que presentó menor cantidad de sal. Estos valores son similares a los obtenidos en este estudio, teniendo en consideración los resultados tanto de la miga como de la corteza del pan (ver Tabla 12).

**Tabla 10.** Información nutricional de panes industriales por 100 g de producto

	BARRA	BARRA INTEGRAL	PAN CANDEAL	PAN DE MOLDE
<b>Valor energético (Kcal)</b>	269,5 ± 2,12	254 ± 38,18	263,15 ± 22,41 <b>c</b>	270 ± 15,55
<b>Grasas (g)</b>	1,30 ± 0	1,80 ± 0,42	1,45 ± 0,35	2,50 ± 0,71
<b>AGS (g)</b>	0,20 ± 0	0,225 ± 0,04	0,25 ± 0,07	0,35 ± 0,07
<b>AGM (g)</b>	0,30 ± np	np	0,30 ± np	0,35 ± 0,07
<b>AGP (g)</b>	0,80 ± np	np	0,70 ± np	0,95 ± 0,35
<b>HCO (g)</b>	54,70 ± 0,99	48,00 ± 8,49	53,05 ± 4,17	51,35 ± 3,46
<b>Azúcares (g)</b>	1,80 ± 1,27	2,45 ± 1,77	3,40 ± 1,13	2,55 ± 0,64
<b>Fibra (g)</b>	2,90 ± np	5,45 ± 0,35	3,40 ± np	3,70 ± np
<b>Proteínas (g)</b>	8,65 ± 0,35	8,60 ± 0,28	8,35 ± 0,64	10,20 ± 0,99
<b>Sal (g)</b>	1,60 ± np	1,19 ± 0,13	1,70 ± 0,42	1,59 ± 0,58

np: no presentado. c: calculado. Los valores se muestran con la media de los panes de ambos establecimientos industriales ± desviación estándar. Los datos con DS no presentada son debidos a la ausencia del valor nutricional en uno de los dos panes, por lo que la media que se muestra es el dato de un único pan.

### 5.1.2 Actividad de agua

En la Tabla 13 se muestran los valores medios de la  $a_w$  para los distintos tipos de panes, tanto en la corteza como en la miga, según el tipo de elaboración artesanal e industrial. La corteza del pan candeal industrial fue el que mostró la menor  $a_w$  (0,811±0,011), y la corteza del pan de molde industrial la que mostró la mayor  $a_w$  (0,939±0,008). La miga de la barra industrial fue la que presentó la mayor  $a_w$  (0,980±0,005) y la miga del pan candeal industrial la que mostró la menor  $a_w$  (0,959±0,012). Respecto al tipo elaboración no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los panes industriales y artesanales. Los valores de  $a_w$  de las cortezas de la barra, de la barra integral y del pan candeal fueron inferiores a 0,90. No se han

podido comparar estos datos con la bibliografía debido a la falta de estudios en panes españoles.

En el caso del pan de molde, tanto artesanal como industrial, la  $a_w$  para la corteza (0,926 y 0,939, respectivamente) supera ampliamente el valor obtenido para el resto de las cortezas de los distintos panes, con una diferencia de al menos 0,036, observándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la corteza del pan de molde tanto artesanal e industrial y las cortezas de la barra y pan candeal artesanal e industrial. Además, estos valores fueron superiores a los encontrados por Czuchajowska et al. (18) en la corteza del pan de molde ( $a_w$  de 0,840).

Respecto a la  $a_w$  de las migas, todas muestran valores superiores a 0,95 y son muy similares entre sí. No se han encontrados estudios sobre la  $a_w$  en distintos panes que hayan diferenciado entre corteza y miga. Estos valores fueron inferiores a los encontrados por Gostin (52), quien encontró una  $a_w$  en pan blanco y pan integral de 0,970 y 0,982, respectivamente. A pesar de que ese autor no diferencia entre miga y corteza, en el caso del pan blanco los datos son similares a los encontrados en la miga de la barra tanto artesanal ( $0,978 \pm 0,009$ ) como industrial ( $0,980 \pm 0,005$ ). También se encuentran semejanzas entre los valores  $a_w$  mostrados en el pan integral por ese autor con los datos de la miga de la barra integral tanto artesanal como industrial ( $a_w$  0,979) de este trabajo de investigación. Comparando la  $a_w$  de la miga entre los distintos panes, se han encontrado diferencias significativas en el contenido de  $a_w$  entre la barra integral y el pan candeal artesanales, y entre la barra y el pan candeal industriales.

Cabe destacar que la miga del pan de molde industrial mostró una  $a_w$  ( $0,963 \pm 0,014$ ) inferior a la  $a_w$  de la barra y la barra integral de mismo tipo elaborador. Estos valores son similares a los encontrado por Czuchajowska et al. (18) quienes estudiaron la evolución de la  $a_w$  en las distintas partes de la miga, cuyo valor inicial fue de 0,965 para la miga del pan de molde. Hasta el momento de la revisión bibliográfica no se encontrados otros estudios que lleven a cabo la diferencia entre la  $a_w$  de la corteza y de la miga del pan de molde. Así mismo, Kang et al. (53) encontraron valores de  $a_w$  (0,950) para el pan de molde similares a los encontrados en este estudio.

**Tabla 13.** Contenido medio de  $a_w$  en corteza y miga de panes elaborados artesanal e industrialmente

		ESTABLECIMIENTOS ARTESANALES		ESTABLECIMIENTOS INDUSTRIALES	
		$a_w$	Límites (mínimo; máximo)	$a_w$	Límites (mínimo; máximo)
<b>BARRA</b>	<b>CORTEZA</b>	0,829 ± 0,002 <sup>1</sup>	0,827; 0,833	0,830 ± 0,005 <sup>1</sup>	0,824; 0,837
	<b>MIGA</b>	0,978 ± 0,009 <sup>a</sup>	0,967; 0,991	0,980 ± 0,005 <sup>a,b</sup>	0,973; 0,987
<b>BARRA INTEGRAL</b>	<b>CORTEZA</b>	0,890 ± 0,037 <sup>2,3</sup>	0,844; 0,938	0,887 ± 0,029 <sup>2</sup>	0,849; 0,925
	<b>MIGA</b>	0,979 ± 0,004 <sup>a,b</sup>	0,975; 0,984	0,979 ± 0,015 <sup>a</sup>	0,960; 0,998
<b>PAN CANDEAL</b>	<b>CORTEZA</b>	0,839 ± 0,026 <sup>1,2</sup>	0,805; 0,873	0,811 ± 0,011 <sup>3</sup>	0,798; 0,826
	<b>MIGA</b>	0,967 ± 0,007 <sup>a,c</sup>	0,958; 0,977	0,959 ± 0,012 <sup>a,c</sup>	0,945; 0,975
<b>PAN DE MOLDE</b>	<b>CORTEZA</b>	0,926 ± 0,017 <sup>3</sup>	0,905; 0,948	0,939 ± 0,008 <sup>4</sup>	0,929; 0,950
	<b>MIGA</b>	0,978 ± 0,016 <sup>a</sup>	0,958; 0,999	0,963 ± 0,014 <sup>a</sup>	0,945; 0,981

Los valores de  $a_w$  se expresan por media ± desviación estándar (n=4). El nivel de significación se estableció en un 99% ( $\alpha=0,01$ ). <sup>1,2,3,4</sup>, valores con distintos números indican las diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre cortezas de los diversos tipos de panes a través del análisis de *t-Student*; <sup>a,b,c</sup>, valores en columnas con distintas letras indican las diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre migas de los diversos tipos de panes a través del análisis de *t-Student*.

### 5.1.3 pH

En la Tabla 14 se muestra el pH promedio según el tipo de establecimiento para los distintos tipos de panes. Los datos obtenidos para el pH de los distintos panes fueron similares entre sí, entre corteza y miga y entre los distintos tipos de producción, por lo que no se muestran diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre ellos salvo en el caso de la miga del pan integral artesanal y la miga del pan candeal artesanal, así como en el caso de la miga del pan candeal industrial y la miga del pan de molde industrial ( $p<0,05$ ). De hecho, es la miga del pan de molde industrial la que presentó el menor pH ( $5,54\pm 0,17$ ) y la miga de la barra artesanal la que mayor pH mostró ( $6,05\pm 0,56$ ).

Respecto al pH de las cortezas no hay grandes diferencias entre los distintos panes, encontrando el menor pH en la corteza del pan de molde industrial ( $5,56\pm 0,14$ ) y el mayor en la corteza del pan candeal industrial, con un pH de  $5,82\pm 0,22$ , sin mostrar diferencias significativas entre ellos ( $p>0,05$ ). Así mismo, no se han encontrado estudios que diferencien el pH en la corteza y en la miga del pan. Kang et al. (53) mostraron un valor de pH de 7,66 para el pan de molde, siendo este valor superior al encontrado en el pan de molde de este estudio ( $5,54-5,78$ ). Sin embargo, Valerio et al. (46) encontraron un valor de pH (5,58) en el pan de molde similar al observado en el pan de molde de origen industrial y ligeramente inferior al pan de molde artesanal de este trabajo de

investigación. Así mismo, estos autores encontraron un valor de pH (5,67) similar a los obtenidos en la barra y en el pan candeal artesanal, pero inferiores a los observados en la miga de la barra artesanal (pH 6,05±0,56) obtenidos en este trabajo.

**Tabla 14.** Contenido medio de pH en corteza y miga de panes elaborados artesanal e industrialmente

		ESTABLECIMIENTOS ARTESANALES		ESTABLECIMIENTOS INDUSTRIALES	
		pH	Límites (mínimo; máximo)	pH	Límites (mínimo; máximo)
<b>BARRA</b>	<b>CORTEZA</b>	5,62 ± 0,01 <sup>1</sup>	5,60; 5,64	5,60 ± 0,19 <sup>1</sup>	5,36; 5,85
	<b>MIGA</b>	6,05 ± 0,56 <sup>a</sup>	5,32; 6,77	5,59 ± 0,29 <sup>a</sup>	5,21; 5,97
<b>BARRA INTEGRAL</b>	<b>CORTEZA</b>	5,73 ± 0,14 <sup>1</sup>	5,56; 5,91	5,72 ± 0,24 <sup>1</sup>	5,41; 6,02
	<b>MIGA</b>	5,97 ± 0,04 <sup>a,b</sup>	5,92; 6,02	5,76 ± 0,25 <sup>a</sup>	5,44; 6,09
<b>PAN CANDEAL</b>	<b>CORTEZA</b>	5,64 ± 0,27 <sup>1</sup>	5,30; 5,99	5,82 ± 0,22 <sup>1</sup>	5,54; 6,1
	<b>MIGA</b>	5,69 ± 0,18 <sup>a,c</sup>	5,46; 5,93	5,92 ± 0,20 <sup>a,b</sup>	5,66; 6,18
<b>PAN DE MOLDE</b>	<b>CORTEZA</b>	5,67 ± 0,18 <sup>1</sup>	5,44; 5,91	5,56 ± 0,14 <sup>1</sup>	5,37; 5,74
	<b>MIGA</b>	5,78 ± 0,34 <sup>a</sup>	5,34; 6,22	5,54 ± 0,17 <sup>a,c</sup>	5,31; 5,76

Los valores de pH se expresan por media ± desviación estándar (n=4). El nivel de significación se estableció en un 99% ( $\alpha=0,01$ ). <sup>1,2</sup>, valores con distintos números indican las diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre cortezas de los diversos tipos de panes a través del análisis de *t-Student*; <sup>a,b,c</sup>, valores en columnas con distintas letras indican las diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre migas de los diversos tipos de panes a través del análisis de *t-Student*.

#### 5.1.4 NaCl

En la Tabla 12 se muestran los resultados medios de cloruro de sodio por tipo de establecimiento para los distintos tipos de panes. En general, los datos de las cortezas oscilaron entre 1,43-1,99% y reflejan una mayor cantidad de cloruro de sodio en comparación con las migas, que presentaron valores entre 1,03-1,55% en el mismo tipo de pan y mismo tipo de establecimiento, observándose al menos una diferencia de 0,10% y hasta 0,56% de NaCl entre ambas partes.

La corteza del pan candeal industrial fue la que mayor cantidad de NaCl (1,99% ± 0,09) presentó. Estos valores estuvieron dentro del rango a los mostrados por Silow et al. (54) quienes encontraron un contenido de cloruro de sodio de 1,63% para diversos tipos de panes españoles. Comparando el contenido de NaCl en la corteza de los panes artesanales solo se observaron diferencias significativas entre el pan de candeal y el pan de molde ( $p<0,05$ ). Las cortezas de los panes industriales mostraron una mayor variabilidad, observándose diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre la corteza de la

barra, la barra integral y el pan de molde, y entre el pan candeal, la barra integral y el pan de molde.

Las migas del pan candeal, tanto de origen artesanal como industrial, fueron las que presentaron mayor cantidad de NaCl (1,50-1,55%), mientras que la miga del pan de molde artesanal fue la que menor cantidad de NaCl (1,03% ± 0,08) presentó. Estos valores fueron superiores a los encontrados por Kang et al. (53) quienes observaron un contenido de NaCl en el pan de molde de 0,17%, mostrando al menos 0,76% de diferencia entre panes. Se ha encontrado una alta variabilidad en el contenido de NaCl en las migas de los panes artesanales, mostrando diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre de la barra y el pan molde artesanal, así como entre la barra y la barra integral industrial y, finalmente, entre la barra integral y pan candeal industrial.

**Tabla 12.** Contenido medio de NaCl en corteza y miga de panes elaborados artesanal e industrialmente

		ESTABLECIMIENTOS ARTESANALES		ESTABLECIMIENTOS INDUSTRIALES	
		% NaCl	Límites (mínimo; máximo)	% NaCl	Límites (mínimo; máximo)
BARRA	CORTEZA	1,74 ± 0,47 <sup>1</sup>	1,14; 2,34	1,89 ± 0,03 <sup>1</sup>	1,85; 1,93
	MIGA	1,36 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,17; 1,55	1,33 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,28; 1,38
BARRA INTEGRAL	CORTEZA	1,68 ± 0,26 <sup>1</sup>	1,34; 2,01	1,45 ± 0,20 <sup>2</sup>	1,19; 1,71
	MIGA	1,26 ± 0,17 <sup>a,b</sup>	1,04; 1,48	1,16 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,09; 1,23
PAN CANDEAL	CORTEZA	1,89 ± 0,09 <sup>1,2</sup>	1,77; 2,01	1,99 ± 0,09 <sup>1</sup>	1,88; 2,11
	MIGA	1,50 ± 0,03 <sup>a,c</sup>	1,46; 1,53	1,55 ± 0,18 <sup>a,c</sup>	1,32; 1,78
PAN DE MOLDE	CORTEZA	1,45 ± 0,01 <sup>1,3</sup>	1,43; 1,47	1,43 ± 0,33 <sup>2</sup>	1,01; 1,85
	MIGA	1,03 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,93; 1,13	1,33 ± 0,37 <sup>a,b</sup>	0,85; 1,81

Los valores de NaCl se expresan por media ± desviación estándar (n=4). El nivel de significación se estableció en un 99% ( $\alpha=0,01$ ). <sup>1,2,3</sup>, valores con distintos números indican las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre cortezas de los diversos tipos de panes a través del análisis de *t-Student*; <sup>a,b,c</sup>, valores en columnas con distintas letras indican las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre migas de los diversos tipos de panes a través del análisis de *t-Student*.

## 5.2 MODELOS DE CRECIMIENTO PREDICTIVO PARA *BACILLUS CEREUS*

Se realizaron las modelizaciones del crecimiento de *B. cereus* en la miga de diversos tipos de pan: barra, barra integral, pan candeal y pan de molde; bajo diversas condiciones:  $a_w$  mínima,  $a_w$  media,  $a_w$  máxima, pH mínimo, pH medio, pH máximo y sus posibles combinaciones para crear condiciones de crecimiento que podríamos encontrar en los panes señalados. Se seleccionaron únicamente la miga de estos panes debido a

que los datos de  $a_w$  son mayores a 0,92, valor de  $a_w$  mínimo para permitir el crecimiento de *B. cereus* (42). Debido a este motivo no se ha realizado la modelización para las cortezas de los distintos tipos de panes, excepto para las cortezas de pan de molde tanto artesanal como industrial que presentaron valores de  $a_w$  entre 0,926-0,936 (ver Tabla 13). Sin embargo, no hay estudios sobre el crecimiento de esta bacteria en panes artesanales e industriales, y menos aun diferenciando la corteza y la miga. *B. cereus* es capaz de resistir el proceso de horneado del pan, como lo demuestra De Bellis et al. (55), al simular la germinación y crecimiento de este microorganismo según las condiciones de horneado del pan. Así mismo, estos autores indican que han aislado las cepas de este microorganismo esporulado tanto de ingredientes utilizados para la elaboración, de harinas y de panes, y que además estas cepas son citotóxicas.

La temperatura utilizada para todas las modelizaciones de crecimiento se estableció en 24 °C. No se realizaron variaciones en cuanto a este parámetro debido a que se consideró que los panes adquiridos se consumen normalmente en el mismo día que se compraron y se almacenan a temperatura ambiente durante este tiempo, siendo también la temperatura media que se puede encontrar en los establecimientos de venta. En los casos en los que no se consumen en un mismo día y se almacenan a otra temperatura se ha considerado que no se realiza a temperatura de refrigeración, donde sí podrían germinar las esporas de *B. cereus* (42), sino que se almacenan en congelación en cuyo caso se inhibe la germinación y multiplicación de las esporas (temperatura de germinación de esporas de *B. cereus*: 4 °C-55 °C (38)). Además, según la EFSA (42) y Kramer et al. (38), las esporas pueden germinar a una  $a_w \geq 0,92$ , valor de actividad de agua que superan todas las migas de los panes españoles.

En la Tabla 15 se muestran los parámetros medios de crecimiento a pH y  $a_w$  de la miga de cada tipo de pan y tipo de establecimiento artesanal e industrial modelizado a través *ComBase*. Se observó una mayor velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) para *B. cereus* en las migas de los panes artesanales (0,100-0,194 h<sup>-1</sup>) respecto a las migas de los panes industriales (0,079-0,184 h<sup>-1</sup>), aunque no existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre elaboradores. Sin embargo, se han encontrado diferencias significativas para la  $\mu_{max}$  entre las distintas variedades de panes, por ejemplo, barra y pan candeal o barra y pan de molde (ver Tabla 14). Este hecho nos indica que *B. cereus* puede crecer en los panes españoles, especialmente en la barra o pan blanco.

Los valores de tiempo duplicación (TD) fueron superiores en el pan candeal y pan de molde industriales, alcanzando 4,16 y 5,11 h, respectivamente. Es decir, *B. cereus* crecería más despacio en estos tipos de panes. Comparando los TD de los distintos

tipos de panes, estos mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la barra y la barra integral del mismo origen. Respecto a la fase latencia ( $\lambda$ ) el pan candeal y pan de molde industriales fueron los que mostraron una  $\lambda$  más alta, 49,08 y 60,02 h, respectivamente. Estos valores fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) con la barra y la barra integral (22,05 y 22,63, respectivamente) industriales. Así mismo, estos valores fueron superiores a los observados a distintos valores de  $a_w$  (0,960-0,980) y pH (5,50-6,02) en los distintos panes, y fueron inferiores en comparación a los resultados obtenidos por otros autores (53) quienes encontraron una  $\lambda$  de 13,44 h en rebanadas de pan con una  $a_w$  de 0,95, un pH de 7,66 a 24 °C, utilizando el modelo de Gompertz. Esta diferencia se debe principalmente a que en este trabajo de investigación se han utilizados valores de pH y  $a_w$  más bajos que los usados por los autores antes mencionados. Teniendo en consideración los valores de  $\mu_{max}$  y de  $\lambda$ , *B. cereus* es capaz de crecer más rápido en la miga del pan de molde y barra artesanales y en la barra y barra integral industriales, siendo estos tipos de panes los que podrían considerarse como un posible riesgo potencial, debido a que sus condiciones de pH y  $a_w$  permiten el desarrollo de este microorganismo.

**Tabla 15.** Valores medios de velocidad máxima de crecimiento, tiempo de duplicación y fase de latencia de *B. cereus* en las migas de los diferentes tipos de panes en establecimientos artesanales e industriales

MIGA		$a_w$	pH	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	TD (h)	$\lambda$ (h)
BARRA	ART	0,979±0,009	6,05±0,56	0,192±0,032 <sup>1</sup>	1,58±0,26 <sup>1</sup>	18,76±3,10 <sup>1</sup>
	IND	0,980±0,005	5,59±0,30	0,172±0,062 <sup>a</sup>	1,87±0,66 <sup>a</sup>	22,05±7,86 <sup>a</sup>
BARRA INTEGRAL	ART	0,979±0,004	5,97±0,04	0,191±0,037 <sup>1</sup>	1,60±0,31 <sup>1</sup>	19,00±3,66 <sup>1</sup>
	IND	0,979±0,015	5,76±0,25	0,184±0,099 <sup>a</sup>	1,91±1,03 <sup>a</sup>	22,63±12,18 <sup>a</sup>
PAN CANDEAL	ART	0,967±0,007	5,69±0,18	0,100±0,043 <sup>2,3</sup>	3,61±1,84 <sup>2,3</sup>	39,40±17,27 <sup>2,3</sup>
	IND	0,960±0,012	5,92±0,20	0,079±0,033 <sup>b</sup>	4,16±1,75 <sup>b</sup>	49,08±20,52 <sup>b</sup>
PAN DE MOLDE	ART	0,979±0,016	5,78±0,34	0,194±0,152 <sup>1,3</sup>	2,22±1,73 <sup>1,3</sup>	26,36±20,61 <sup>1,3</sup>
	IND	0,963±0,014	5,54±0,17	0,081±0,060 <sup>b</sup>	5,11±3,79 <sup>b</sup>	60,02±44,26 <sup>b</sup>

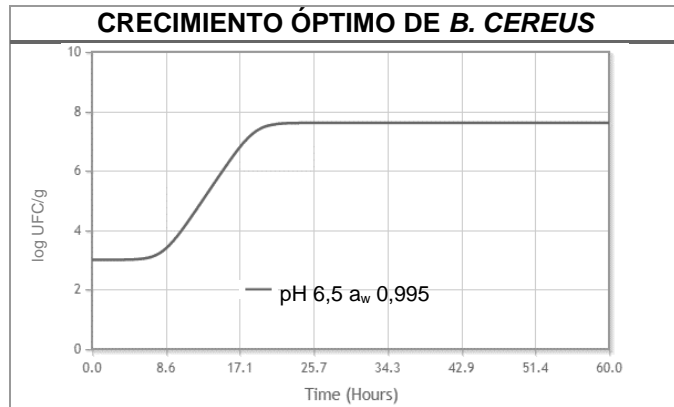
$\mu_{max}$ : velocidad máxima. TD: tiempo de duplicación.  $\lambda$ : tiempo de latencia. ART: establecimiento artesanal. IND: establecimiento industrial. Los valores de  $a_w$ , pH, velocidad máxima y tiempo de duplicación se expresan por media  $\pm$  desviación estándar (n=4). Las condiciones de crecimiento establecidas son a pH medio y  $a_w$  media de cada tipo de pan, a temperatura de 24 °C. <sup>1,2,3</sup>, valores con distintos números indican las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre establecimientos artesanales en los diversos tipos de panes a través del análisis de *t-Student* (n=8); <sup>a,b</sup>, valores en columnas con distintas letras indican las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre establecimientos industriales en los diversos tipos de panes a través del análisis de *t-Student* (n=8).

En la Figura 5 se muestra el crecimiento de *B. cereus* bajo condiciones de pH y  $a_w$  óptimas (pH 6,5 y  $a_w$  0,995). La modelización del crecimiento óptimo se realizó a temperatura de 24 °C a fin de poder comparar con el resto de predicciones de crecimiento, pues es la temperatura media, de forma general, de venta en los

establecimientos y la temperatura media de conservación tras su compra por parte de los compradores.

En las Figuras 6 y 7 se muestra la modelización de crecimiento de *B. cereus* en las migas de la barra y barra integral tanto artesanal como industrial bajo diversas condiciones de pH y  $a_w$ .

La miga de la barra artesanal a pH y  $a_w$  máximo, (pH 6,8 y  $a_w$  0,991) es la que presenta una mayor  $\mu_{max}$  0,437 h<sup>-1</sup>, un menor



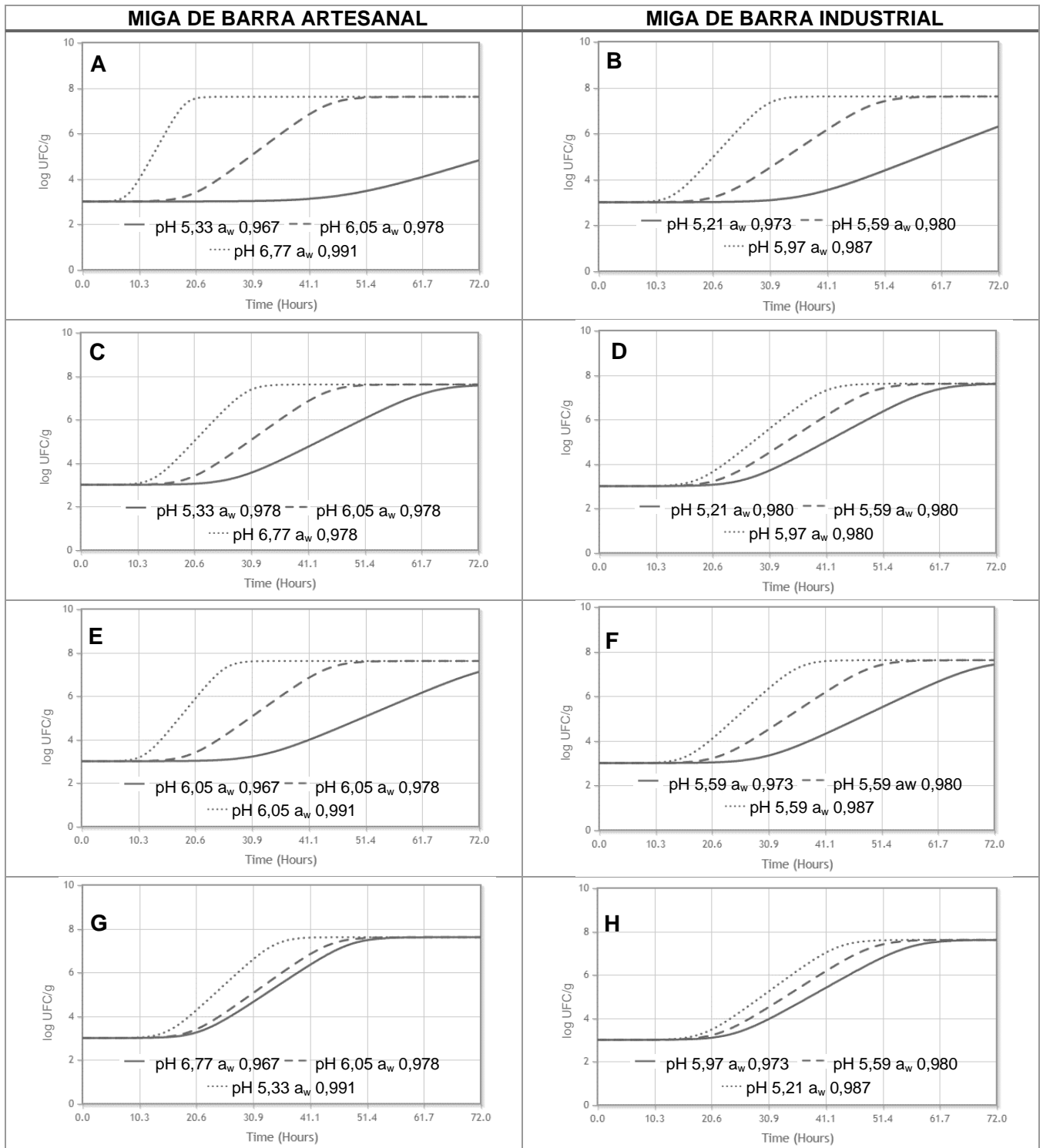
**Fig. 5.** Crecimiento de *B. cereus* bajo condiciones óptimas de pH y  $a_w$  a 24 °C de temperatura.  $\mu_{max}$  0,433 h<sup>-1</sup>. TD 0,695 h.  $\lambda$  8,22 h

TD (0,689 h) y menor  $\lambda$  (8,15 h) en comparación con la barra industrial. De hecho, la miga de la barra industrial en las mismas condiciones de pH y  $a_w$  máximo (pH 6 y  $a_w$  0,987) presentó una  $\mu_{max}$  de 0,268 h<sup>-1</sup>, un TD de 1,123 h y  $\lambda$  de 13,29 h. *B. cereus* puede crecer en la miga de la barra artesanal, que muestra una  $\mu_{max}$  y TD similares a los observados a pH y  $a_w$  óptimos (pH 6,5 y  $a_w$  0,995). Los resultados de las modelizaciones indican que una disminución de 0,5 de pH provoca un descenso de 0,100 h<sup>-1</sup> de  $\mu_{max}$  para el crecimiento de *B. cereus* (datos no mostrados en tablas, ver Anexo 7). Los valores de  $\mu_{max}$  a pH y  $a_w$  mínimos (pH 5,3 y  $a_w$  0,967) fueron muy reducidos entre  $\mu_{max}$  0,075 h<sup>-1</sup> y  $\mu_{max}$  0,096 h<sup>-1</sup> y una  $\lambda$  alta (31,1 y 47,48 h). Estos resultados indican que, si se controla el pH y la  $a_w$  en la elaboración del pan, se evitaría el crecimiento de microorganismos esporulados como *B. cereus*.

En la Figura 7 se muestra la modelización de crecimiento de *B. cereus* en la miga de la barra integral artesanal y la miga de la barra integral industrial bajo diversas condiciones de pH y  $a_w$ . Los valores obtenidos para  $\mu_{max}$ , TD y  $\lambda$  fueron similares a los encontrados en la barra. Cabe destacar la variabilidad observada en el pH (6,1-5,4) y en la  $a_w$  (0,96-0,998) en la miga de la barra integral industrial, mostrando también una importante variación en los valores de  $\mu_{max}$  (0,055-0,396). De acuerdo con Fangio et al. (56) se requieren 10<sup>5</sup> células de *B. cereus* por gramo para producir la enfermedad. Teniendo en consideración los resultados obtenidos de la predicción de crecimiento de *B. cereus*, esa concentración se alcanzaría en 24 horas en la miga de la barra artesanal a pH y  $a_w$  máximo (pH 6,8 y  $a_w$  0,991), a pH máximo y  $a_w$  media (pH 6,8 y  $a_w$  0,978) a pH medio y  $a_w$  máxima (pH 6,05 y  $a_w$  0,991), a pH mínimo y  $a_w$  máxima (pH 5,3 y  $a_w$



0,991), y en la miga de la barra industrial a pH y  $a_w$  máximo (pH 6 y  $a_w$  0,987) y a pH medio y  $a_w$  máxima (pH 5,6 y  $a_w$  0,987).

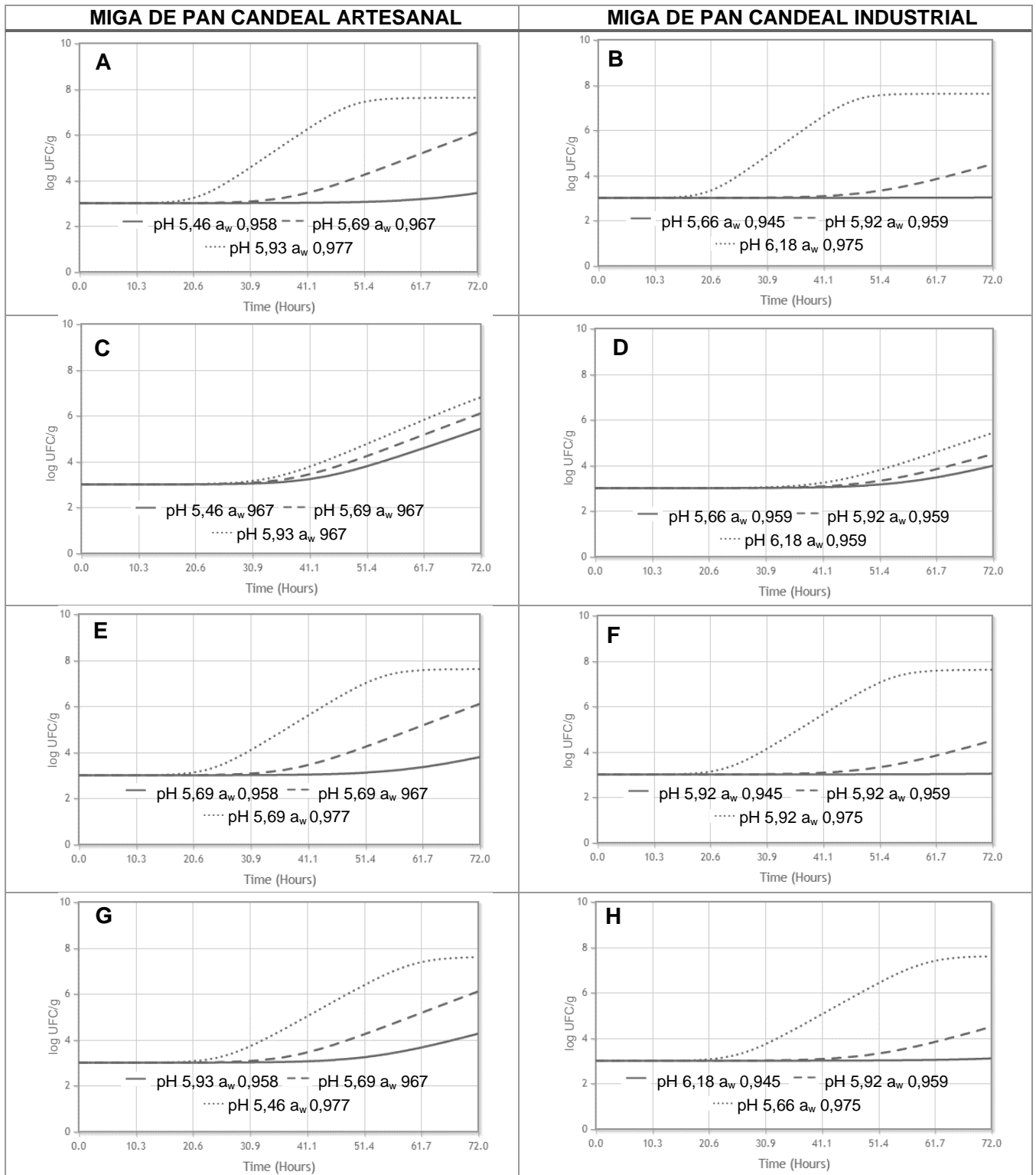


**Fig. 6.** Comparación del crecimiento de *B. cereus* en la miga de barra artesanal e industrial bajo distintas condiciones de pH y  $a_w$ , a temperatura de 24 °C. **A:** miga de barra artesanal a: — pH y  $a_w$  mínimo, -- pH y  $a_w$  medio, ..... pH y  $a_w$  máximo, **B:** miga de barra industrial a: — pH y  $a_w$  mínimo, -- pH y  $a_w$  medio, ..... pH y  $a_w$  máximo, **C:** miga de barra artesanal a una  $a_w$  media fija, — pH mínimo, -- pH medio, ..... pH máximo, **D:** miga de barra industrial a una  $a_w$  media fija, — pH mínimo, -- pH medio, ..... pH máximo, **E:** miga de barra artesanal a pH medio fijo, —  $a_w$  mínimo, --  $a_w$  medio, .....  $a_w$  máximo, **F:** miga de barra industrial a pH medio fijo, —  $a_w$  mínimo, --  $a_w$  medio, .....  $a_w$  máximo, **G:** miga de barra artesanal a: — pH máximo,  $a_w$  mínima, -- pH medio,  $a_w$  media, ..... pH mínimo,  $a_w$  máximo, **H:** miga de barra artesanal a: — pH máximo,  $a_w$  mínima, -- pH medio,  $a_w$  media, ..... pH mínimo,  $a_w$  máximo. Valores de crecimiento en la Tabla 16 (Anexo 8).

En la Figura 8 se muestra la modelización para el crecimiento de *B. cereus* en la miga del pan candeal artesanal y en la miga del pan candeal industrial bajo diversas condiciones de pH y  $a_w$ . El crecimiento de *B. cereus* en la miga del pan candeal de ambos establecimientos es muy similar entre sí.

La miga del pan candeal industrial a pH y  $a_w$  máximo (pH 6,2 y  $a_w$  0,975) muestra la mayor  $\mu_{max}$ , el menor TD y el menor  $\lambda$  ( $\mu_{max}$  0,176 h<sup>-1</sup>, TD 1,713 h y  $\lambda$  20,23 h). La miga del pan candeal artesanal a pH y  $a_w$  mínimo (pH 5,5 y  $a_w$  0,958) fue donde se observaron los datos de menor crecimiento con una  $\mu_{max}$  de 0,021 h<sup>-1</sup>, un TD de 14,376 h y una  $\lambda$  de 169,58 h.

Según las condiciones antes previstas, en ningún caso se superaría la concentración de *B. cereus* que puede causar patología (5 log UFC/g) (38) (42) antes de las 30 h a 24 °C. De hecho, en algunos casos no se alcanza esta concentración antes de las 72 horas, por ejemplo, en el caso de la miga del pan candeal artesanal e industrial a pH y  $a_w$  mínimos, (pH 5,5 y  $a_w$  0,958, pH 5,7 y  $a_w$  0,945, respectivamente), a pH medio y  $a_w$  mínimo ni a pH máximo y  $a_w$  mínimo. Las características de pH y  $a_w$  de la miga de este tipo de pan hacen que disminuya el riesgo de la proliferación de *B. cereus*, siendo el pan candeal artesanal el que menor riesgo higiénico-sanitario implica.



**Fig. 8.** Comparación del crecimiento de *B. cereus* en la miga de pan candeal artesanal e industrial bajo distintas condiciones de pH y  $a_w$ , a temperatura de 24 °C. **A:** miga de pan candeal artesanal a: — pH y  $a_w$  mínimo, -- pH y  $a_w$  medio, ..... pH y  $a_w$  máximo, **B:** miga de pan candeal industrial a: — pH y  $a_w$  mínimo, -- pH y  $a_w$  medio, ..... pH y  $a_w$  máximo, **C:** miga de pan candeal artesanal a una  $a_w$  media fija, — pH mínimo, -- pH medio, ..... pH máximo, **D:** miga de pan candeal industrial a una  $a_w$  media fija, — pH mínimo, -- pH medio, ..... pH máximo, **E:** miga de pan candeal artesanal a pH medio fijo, —  $a_w$  mínimo, --  $a_w$  medio, .....  $a_w$  máximo, **F:** miga de pan candeal industrial a pH medio fijo, —  $a_w$  mínimo, --  $a_w$  medio, .....  $a_w$  máximo, **G:** miga de pan candeal artesanal a: — pH máximo,  $a_w$  mínima, -- pH medio,  $a_w$  media, ..... pH mínimo,  $a_w$  máxima, **H:** miga de pan candeal artesanal a: — pH máximo,  $a_w$  mínima, -- pH medio,  $a_w$  media, ..... pH mínimo,  $a_w$  máxima. Valores de crecimiento en la Tabla 18 (Anexo 8).

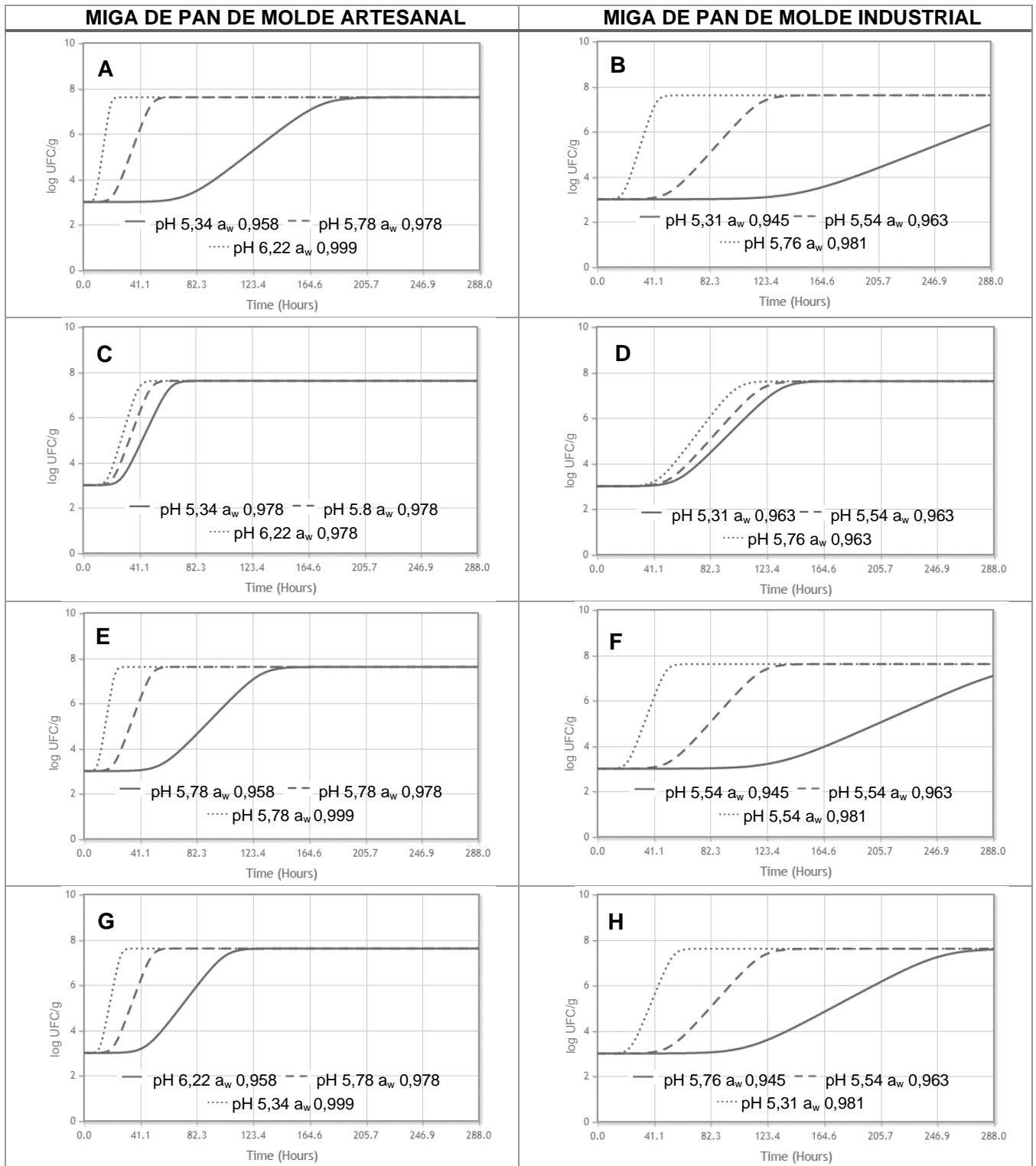
En la Figura 9, 10 (Anexo 7) y 11 se muestra la modelización de crecimiento de *B. cereus* en las migas, las cortezas, así como en las migas de los cuatro establecimientos elaboradores del pan de molde artesanal e industrial, respectivamente.

En general, se mostró un crecimiento más rápido en la miga del pan de molde artesanal que en el industrial. La miga del pan de molde artesanal a pH y  $a_w$  máximo (pH 6,2 y  $a_w$  0,999) presentó la mayor  $\mu_{max}$ , el menor TD y el menor  $\lambda$  ( $\mu_{max}$  0,409 h<sup>-1</sup>, TD 0,736 h y  $\lambda$  8,71 h). Si comparamos los cuatro establecimientos, el pan de molde del establecimiento artesanal 1 (ver Figura 11) fue en el que se predijo el crecimiento más rápido de *B. cereus* ( $\mu_{max}$  0,368 h<sup>-1</sup>, TD 0,819 h y  $\lambda$  9,68 h) en comparación con el establecimiento artesanal n° 2 y los panes de molde de origen industrial.

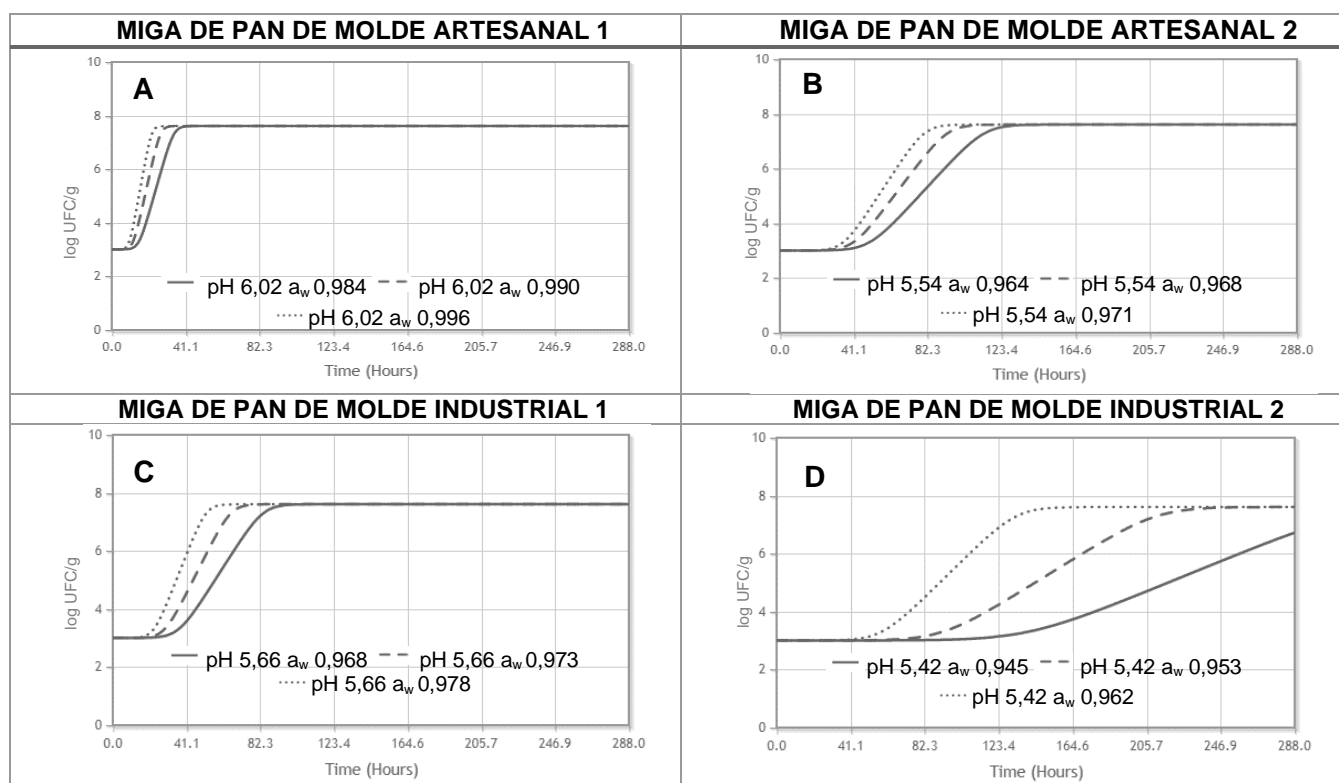
La miga del pan de molde industrial a pH y  $a_w$  mínimo (pH 5,3 y  $a_w$  0,945) mostró el menor ritmo de crecimiento ( $\mu_{max}$  0,024 h<sup>-1</sup>, TD 12,544 h y  $\lambda$  148,38 h). Así mismo, el pan de molde del establecimiento industrial 2 fue el que mostró el menor crecimiento de *B. cereus* ( $\mu_{max}$  0,026 h<sup>-1</sup>, TD 11,791 h y  $\lambda$  136,97 h) (ver Figura 11), mientras que el pan de molde artesanal 2 e industrial 1 muestran unos parámetros de crecimiento muy similares entre sí.

En todos los casos, la miga del pan de molde a 24 °C presenta unas condiciones de  $a_w$  y pH que permiten alcanzar o superar una concentración de 5 log UFC/g de *B. cereus* antes de 12 días (vida media útil del pan de molde) (48). Si comparamos los distintos establecimientos, la miga de pan de molde artesanal fue la que mostró las mejores condiciones para el crecimiento de *B. cereus* ( $\mu_{max}$  0,409 h<sup>-1</sup>, TD 0,736 h y  $\lambda$  8,71 h) en comparación con el pan de molde industrial. Las cortezas del pan de molde no superarían en ningún caso esta concentración antes de los 6 días (140 h aproximadamente) pero sí lo harían a lo largo de los 12 días (288 h) de vida media de este tipo de pan.

En cuanto a los valores de crecimiento de la corteza, mostraron un crecimiento más rápido en la corteza del pan de molde artesanal a pH y  $a_w$  máximo (pH 5,9 y  $a_w$  0,948), con una  $\mu_{max}$  de 0,04 h<sup>-1</sup>, TD de 7,435 h y  $\lambda$  de 89,03 h. El crecimiento más lento lo registró la corteza del pan de molde industrial bajo pH mínimo y  $a_w$  media (a pH 5,4 y  $a_w$  0,940 una  $\mu_{max}$  0,020 h<sup>-1</sup>, TD 15,317 h y  $\lambda$  178,06 h). De forma general, se mostró un crecimiento más agudo en la corteza del pan de molde artesanal que en la corteza del mismo pan industrial, sobre todo bajo condiciones de pH variables (ver Anexos 7 y 8), pero esta velocidad de crecimiento fue muy reducida, por lo tanto, la corteza del pan de molde podría servir de barrera ante una posible contaminación cruzada con *B. cereus*.



**Fig. 9.** Comparación del crecimiento de *B. cereus* en la miga de pan de molde artesanal e industrial bajo distintas condiciones de pH y  $a_w$ , a temperatura de 24 °C. **A:** miga de pan de molde artesanal a: — pH y  $a_w$  mínimo, -- pH y  $a_w$  medio, ..... pH y  $a_w$  máximo, **B:** miga de pan de molde industrial a: — pH y  $a_w$  mínimo, -- pH y  $a_w$  medio, ..... pH y  $a_w$  máximo, **C:** miga de pan de molde artesanal a una  $a_w$  media fija, — pH mínimo, -- pH medio, ..... pH máximo, **D:** miga de pan de molde industrial a una  $a_w$  media fija, — pH mínimo, -- pH medio, ..... pH máximo, **E:** miga de pan de molde artesanal a pH medio fijo, —  $a_w$  mínimo, --  $a_w$  medio, .....  $a_w$  máximo, **F:** miga de pan de molde industrial a pH medio fijo, —  $a_w$  mínimo, --  $a_w$  medio, .....  $a_w$  máximo, **G:** miga de pan de molde artesanal a : — pH máximo,  $a_w$  mínima, -- pH medio,  $a_w$  media, ..... pH mínimo,  $a_w$  máximo, **H:** miga de pan de molde artesanal a : — pH máximo,  $a_w$  mínima, -- pH medio,  $a_w$  media, ..... pH mínimo,  $a_w$  máximo. Valores de crecimiento en la Tabla 19 (Anexo 8).



**Fig. 11.** Comparación del crecimiento de *B. cereus* entre la miga de los panes de molde artesanal 1 y artesanal 2, y comparación entre la miga de los panes de molde industrial 1 e industrial 2 bajo las mismas condiciones de pH y  $a_w$ , a temperatura de 24 °C. **A:** miga de pan de molde artesanal 1 a: pH medio fijo, —  $a_w$  mínimo, --  $a_w$  medio, .....  $a_w$  máximo, **B:** miga de pan de molde artesanal 2 a: pH medio fijo, —  $a_w$  mínimo, --  $a_w$  medio, .....  $a_w$  máximo, **C:** miga de pan de molde industrial 1 a pH medio fijo, —  $a_w$  mínimo, --  $a_w$  medio, .....  $a_w$  máximo, **D:** miga de pan de molde industrial 2 a pH medio fijo, —  $a_w$  mínimo, --  $a_w$  medio, .....  $a_w$  máximo. Valores de crecimiento en la Tabla 21 (Anexo 8).

## 6 CONCLUSIONES

Considerando que la actividad de agua de las migas de todos los panes estudiados superó los 0,92, valor considerado como mínimo de crecimiento de *B. cereus*, se concluye que este microorganismo podría crecer en panes españoles.

Entre los panes españoles estudiados, la barra artesanal presentó la segunda  $a_w$  más alta (0,979) y el mayor pH (6,05). Los parámetros de crecimiento microbiano ( $\mu_{max}$  0,437  $h^{-1}$ , TD 0,689 h y  $\lambda$  8,15 h) obtenidos de la predicción del crecimiento de *B. cereus*, a través de la base datos ComBase, utilizando estos valores de  $a_w$  y pH indican que este microorganismo crecería adecuadamente en este tipo de pan, alcanzando la dosis infectiva de *B. cereus* en las primeras 24 horas.

Los valores de pH (5,92) y  $a_w$  (0,959) y la mayor concentración de NaCl (1,55%) encontrados en la miga del pan candeal hacen de este pan el más seguro desde el punto de vista higiénico-sanitario, pues el crecimiento de *B. cereus* fue más lento ( $\mu_{max}$  0,079  $h^{-1}$ ) bajo estas condiciones.

El adecuado control del pH y de la  $a_w$  durante la elaboración podrían ayudar a prevenir el crecimiento de microorganismos esporulados como *B. cereus* en el pan.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

---

1. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Informe del Consumo Alimentario en España 2018. Gob España [Internet]. 2018; 242. Available from: <https://cutt.ly/Nr5jQb6>
2. Agrarios M, General D, Mercados DEPY, Mapa A. Dirección General de Producciones y Evolución de los balances de cereales en España Campañas 2017 / 2018 y 2018 / 2019. 2019; 2017–9.
3. De la Horra AE, Seghezzi ML, Molfese E, Ribotta PD, León AE. Indicadores de calidad de las harinas de trigo: Índice de calidad industrial y su relación con ensayos predictivos. *AgriScientia*. 2012; 29 (2): 81–9.
4. Tejera RL, Luis G, González Weller D, Caballero JM, Gutiérrez ÁJ, Rubio C, et al. Metales en harina de trigo; estudio comparativo y control de su seguridad. *Nutr Hosp*. 2013; 28 (2): 506–13.
5. Cappelli A, Oliva N, Cini E. Stone milling versus roller milling: A systematic review of the effects on wheat flour quality, dough rheology, and bread characteristics. *Trends Food Sci Technol*. 2020; 97 (November 2019): 147–55.
6. FAO. Part 3: Feeding the world. *FAO Stat Yearb 2013* [Internet]. 2013; 123–58. Available from: <http://www.fao.org/3/i3107e/i3107e03.pdf>
7. FAO. World agriculture: towards 2015/2030. Prospects by Major Sector [Internet]. 2002. Available from: <http://www.fao.org/3/y4252e/y4252e05a.htm>
8. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Cereales [Internet]. Available from: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/cereales/>
9. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Avances de superficies y producciones agrícolas. Enero 2018. 2018; (4). Available from: [https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/cuaderno\\_enero2018\\_tcm30-444494.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/cuaderno_enero2018_tcm30-444494.pdf)
10. Chaquilla G, Balandrán R, Mendoza AM, Mercado J. Propiedades y posibles aplicaciones de las proteínas de salvado de trigo. *Biotechnol y Ciencias Agropecu*. 2018; 12 (2): 137–47.
11. Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 677/2016, de 16 de diciembre, por el que

- se aprueba la norma de calidad para las harinas, las sémolas y otros productos de la molienda de los cereales. 2016; 88513–9.
12. De Brier N, Hemdane S, Dornez E, Gomand S V., Delcour JA, Courtin CM. Structure, chemical composition and enzymatic activities of pearlins and bran obtained from pearled wheat (*Triticum aestivum* L.) by roller milling. *J Cereal Sci* [Internet]. 2015; 62: 66–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2014.12.009>
  13. Meera Kweon, Louise Slade, Harry Levine DG. Cookie- Versus Cracker-Baking— What’s the Difference? Flour Functionality Requirements Explored by SRC and Alveography. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2014; 54 (1): 115–38. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24188236>
  14. Casta P, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. Resultados de calidad de nuevas variedades de trigo. 2008; Available from: [http://www.itacyl.es/documents/20143/235841/calidad\\_de\\_trigo\\_WEB.pdf/c2a10f8a-dfbb-a411-472d-9374e13b7be4](http://www.itacyl.es/documents/20143/235841/calidad_de_trigo_WEB.pdf/c2a10f8a-dfbb-a411-472d-9374e13b7be4)
  15. Ruíz de Arcaute A. La dureza del trigo, índice de calidad. *Hojas Divulg* [Internet]. 1954; Available from: [https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd\\_1954\\_07.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1954_07.pdf)
  16. Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 308/2019, de 26 de abril, por el que se aprueba la norma de calidad para el pan. *Boletín Of Del Estado* [Internet]. 2019; 113: 50168–75. Available from: <http://www.boe.es>
  17. Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 1137/1984, de 28 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Fabricación, Circulación y Comercio del Pan y Panes Especiales. 1984; Available from: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1984-13859>
  18. Czuchajowska Z, Pomeranz Y. Differential scanning calorimetry, water activity, and moisture contents in bread center and near-crust zones of bread during storage. [Internet]. Vol. 66 (4), *Cereal Chemistry*. 1989. p. 305–9. Available from: Binder 9 Page 28
  19. Quail KJ. *Arabic Bread Production*. Saint Paul (Minnesota): American Association of Cereal Chemist; 1996. 1–129 p.
  20. Smith JP, Daifas DP, El-Khoury W, Koukoutsis J, El-Khoury A. Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products - A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2004;



- 44 (1): 19–55.
21. Moreiras O. Tablas de composición de alimentos: guía de prácticas. 18th ed. Ciencia y técnica / Pirámide. 2016.
  22. Martínez MM, Román L, Gómez M. Corrigendum to “Implications of hydration depletion in the in vitro starch digestibility of white bread crumb and crust” [Food Chem. 239 (2018) 295–303](S0308814617311020)(10.1016/j.foodchem.2017.06.122). Food Chem [Internet]. 2018; 250: 276. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.035>
  23. Gómez M, Roman L, Martinez MM. Natural and Commercial Alternatives. 2019;
  24. Martinez MM, Gomez M. Current trends in the realm of baking: When indulgent consumers demand healthy sustainable foods. Foods. 2019; 8 (10): 8–10.
  25. Mondal A, Datta AK. Bread baking - A review. J Food Eng. 2008; 86 (4): 465–74.
  26. Condón Abanto S, Raso J, Lyng JG, Álvarez I. Inactivation of *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus plantarum* by UV-C light in flour powder. Innov Food Sci Emerg Technol [Internet]. 2016; 35: 1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2016.03.008>
  27. Cardoso RVC, Fernandes Á, Heleno SA, Rodrigues P, González-Paramás AM, Barros L, et al. Physicochemical characterization and microbiology of wheat and rye flours. Food Chem [Internet]. 2019; 280: 123–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.063>
  28. Eglezos. Erratum: Microbiological quality of wheat grain and flour from two mills in Queensland, Australia. J Food Prot. 2010; 73 (11).
  29. Matos LB. Estudio de los efectos de tres formulaciones diferentes de panes: cambios en su vida útil. Universidad Católica de Córdoba;
  30. Struyf N, Van der Maelen E, Hemdane S, Verspreet J, Verstrepen KJ, Courtin CM. Bread Dough and Baker’s Yeast: An Uplifting Synergy. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2017; 16 (5): 850–67.
  31. León Á, Montoya O, Motato K, Granda DM, Caro C, Restrepo J, et al. Bacterias ácido lácticas silvestres (bal) colombianas presentan buen desempeño panadero en la fabricación de masa acida. VITAE, Rev la Fac Química Farm [Internet]. 2006; 13 (2): 26–35. Available from: <http://bases.bireme.br/cgi->

- bin/wxislind.exe/iah/online/?IisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=Ink&exprSearch=440994&indexSearch=ID
32. Ruiz MJ, Colello R, Padola NL, Etcheverría AI. Inhibitory capacity of *Lactobacillus* spp. against pathogens involved in foodborne diseases. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2017; 49 (2): 174–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.005>
  33. Olivera J. Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche. Univ la Repub [Internet]. 2011; 45. Available from: <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-15316.pdf>
  34. Suárez Machín C, Garrido Carralero NA, Guevara Rodríguez CA. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. ICIDCA Sobre los Deriv la Caña Azúcar. 2016; 50 (1): 20–8.
  35. Fontana AJ. Appendix D: Minimum Water Activity Limits for Growth of Microorganisms. Water Act Foods. 2008;405–405.
  36. Wheeler KA, Hurdman BF, Pitt JI. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. Int J Food Microbiol. 1991; 12 (2–3): 141–9.
  37. Legan JD, Voysey PA. Yeast spoilage of bakery products and ingredients. J Appl Bacteriol. 1991; 70 (5): 361–71.
  38. Kramer JM, Gilbert RJ. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Foodborne bacterial pathogens. New York, USA: Marcel Dekker Inc; 1989.
  39. EFSA. Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). EFSA J. 2013; 11 (1): 138.
  40. Duc LH, Dong TC, Logan NA, Sutherland AD, Taylor J, Cutting SM. Cases of emesis associated with bacterial contamination of an infant breakfast cereal product. Int J Food Microbiol. 2005; 102 (2): 245–51.
  41. Saranraj P, Sivasakthivelan P. Microorganisms involved in spoilage of bread and its control measures. Bread its Fortif Nutr Heal Benefits. 2015; 132–49.
  42. EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in foodstuffs. EFSA J. 2005; 175: 1–48.
  43. Eurosurveillance editorial team. The European Union summary report on trends

- and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. EFSA J. 2012; 10 (3): 1–442.
44. Leuschner R, O'Callaghan J, Arendt E. Part-baked Optimization of baking parameters of part-baked and rebaked Irish brown soda bread by evaluation of some quality characteristics. Int J Food Sci Technol. 1997; 32: 487–93.
  45. Fernández A, Collado J, Cunha LM, Ocio MJ, A. M. Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. Int J Food Microbiol. 2002; 77: 147–53.
  46. Valerio F, Di Biase M, Huchet V, Desriac N, Lonigro SL, Lavermicocca P, et al. Comparison of three *Bacillus amyloliquefaciens* strains growth behaviour and evaluation of the spoilage risk during bread shelf-life. Food Microbiol [Internet]. 2015; 45 (PA):2–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.006>
  47. East African Community. Meat and meat products —Determination of chloride content —Part 2: Potentiometric method. ISO 1841=2:1996(E). 2010;
  48. Elias P. C, Salas W, de Mendiburu D F, de la Cruz Q. W. Estimación del tiempo de vida útil de pan de molde con incorporación de Harina de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) y suero, usando la distribución de Weibull. An Científicos. 2011; 72 (1): 27–33.
  49. Carochio M, Morales P, Ciudad-Mulero M, Fernández-Ruiz V, Ferreira E, Heleno S, et al. Comparison of different bread types: Chemical and physical parameters. Food Chem. 2020;310(June 2019).
  50. Sanz Penella JM, Wronkowska M, Soral Smietana M, Haros M. Effect of whole amaranth flour on bread properties and nutritive value. LWT - Food Sci Technol [Internet]. 2013; 50 (2): 679–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.031>
  51. Miranda Ramos KC, Sanz Ponce N, Haros CM. Evaluation of technological and nutritional quality of bread enriched with amaranth flour. Lwt [Internet]. 2019; 114 (March): 108418. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108418>
  52. Gostin AI. Effects of substituting refined wheat flour with wholemeal and quinoa flour on the technological and sensory characteristics of salt-reduced breads. Lwt [Internet]. 2019; 114 (May): 108412. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108412>

53. Kang KA, Kim YW, Yoon KS. Development of predictive growth models for *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* on various food matrices consisting of ready-to-eat (RTE) foods. Korean J Food Sci Anim Resour. 2010; 30 (5): 730–8.
54. Silow C, Axel C, Zannini E, Arendt EK. Current status of salt reduction in bread and bakery products – A review. J Cereal Sci [Internet]. 2016; 72: 135–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2016.10.010>
55. De Bellis P, Minervini F, Di Biase M, Valerio F, Lavermicocca P, Sisto A. Toxigenic potential and heat survival of spore-forming bacteria isolated from bread and ingredients. Int J Food Microbiol [Internet]. 2015; 197: 30–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.017>
56. Fangio MF, Roura SI, Fritz R. Isolation and Identification of *Bacillus* spp. and Related Genera from Different Starchy Foods. J Food Sci. 2010; 75 (4): 218–21.
57. Campbell GM. Roller Milling of Wheat. In: Handbook of Powder Technology, 12 [Internet]. 2007. p. 383–419. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0167-3785\(07\)12010-8](https://doi.org/10.1016/S0167-3785(07)12010-8)
58. Tejero F. Asesoría Técnica en Panificación Francisco Tejero [Internet]. Moho: prevención en el pan de molde envasado. Available from: <http://www.franciscotejero.com/>
59. Schmidt SJ, Fontana AJ. Appendix E: Water Activity Values of Select Food Ingredients and Products. Water Act Foods. 2008; 2: 407–20.
60. Ferreras Charro R. Análisis reológico de las diferentes fracciones de harina obtenidas en la molienda del grano de trigo. 2009.
61. Wood JA, Malcolmson LJ. Pulse Milling Technologies. Pulse Foods. 2011. 193–221 p.

## 8 ANEXOS

---

### 8.1 ANEXO 1. OBTENCIÓN DE LA HARINA

Los primeros datos sobre la molienda de granos se sitúan en el año 2600 a. C. El fresado o molienda de granos de cereales es una operación fundamental usada actualmente para la producción de harina, que es un ingrediente principal de muchos productos alimenticios. Este proceso se basa en la descomposición de los granos del cereal, separando a continuación el endospermo del salvado y el germen (57).

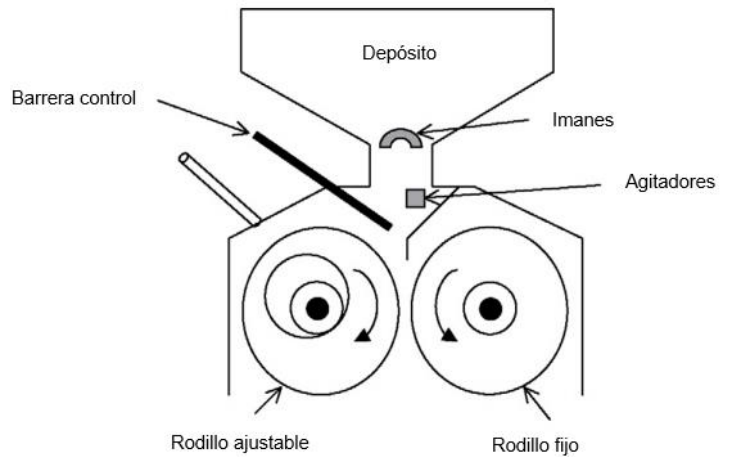
Existen dos métodos predominantes para la molienda de trigo, que son la molienda de piedra y la molienda de rodillos. La molienda de piedra (Figura 12) fue la técnica precursora, estaba formada por dos piedras horizontales colocadas una encima de la otra. Una pieza llamada “cáscara” servía de apoyo a la piedra superior, creando un pequeño espacio entre ambas piedras, y permitía girar a esta piedra mientras que la inferior permanecía inmóvil. A pesar de no ser la técnica más empleada en la actualidad, muchos panaderos y productores de alimentos orgánicos se inclinan por este método debido a su efecto sobre la textura, el sabor dulce y a nuez que genera en el producto final.

La molienda de rodillos (Figura 13) apareció tiempo después y su tecnología siguió evolucionando, siendo a día de hoy el método más utilizado en la industria alimentaria. Consiste en la separación del endospermo del salvado y el germen, seguido de una reducción progresiva del tamaño de la partícula del endospermo. Para ello se utilizan una serie de rodillos ondulados y lisos, tamizando entre cada etapa con un cedazo.

La técnica seleccionada influye significativamente en la calidad de la harina, las propiedades reológicas de la masa y las características del pan y otros productos finales. Pero no solo esto influye en la elaboración de los productos finales derivados de la harina, sino también el tipo de harina utilizada, la cantidad de agua, la temperatura ambiente y de la masa, el tipo de maquinaria para el amasado, la duración de este proceso, el uso de mejoradores de harina de trigo, la variabilidad del operador, la levadura seleccionada y las cepas bacterianas de ácido láctico (5).



**Fig. 12.** Molienda de piedra. Fuente: Wood et al., 2011 (61)



**Fig. 13.** Molienda de rodillos Fuente: Wood et al., 2011 (61)

## 8.2 ANEXO 2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL PAN

*Tabla 3. Características físico-químicas y factores intrínsecos del pan*

	Pan blanco	Pan integral	Pan de molde
<b>Humedad (%)</b>	30 <sup>a</sup>	37,1 ± 0,9 <sup>a,e</sup>	38 <sup>a</sup>
<b>Proteína (%)</b>	7,8 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>
<b>Grasa (%)</b>	1 <sup>b</sup>	1,4 <sup>b</sup>	4,5 <sup>b</sup>
<b>HCO (%)</b>	58 <sup>b</sup>	49 <sup>b</sup>	52 <sup>b</sup>
<b>HCO fácil digestión (%)</b>	2 <sup>b</sup>	2,3 <sup>b</sup>	2,1 <sup>b</sup>
<b>Fibra (g)</b>	2,2 <sup>b</sup>	8,5 <sup>b</sup>	3,2 <sup>b</sup>
<b>Cenizas (%)</b>	2 <sup>c</sup>	0,87 ± 0,05 <sup>e</sup>	0,45 <sup>g</sup>
<b>pH</b>	5,70-5,90 <sup>c</sup>	5,54 <sup>f</sup>	7,66 <sup>h</sup>
<b>a<sub>w</sub></b>	0,949 <sup>d</sup>	0,910 <sup>f</sup>	0,965 <sup>g</sup>
<b>Temperatura (°C)</b>	29,3 <sup>d</sup>	-	-

Fuente: <sup>a</sup>BOE, 1984 (17), <sup>b</sup>Moreiras, 2016 (21), <sup>c</sup>Tejero (58), <sup>d</sup>Schmidt, 2008 (59), <sup>e</sup>Carochoa et al., 2020 (49), <sup>f</sup>Matos (29), <sup>g</sup>Czuchajowska et al., 1989 (18), <sup>h</sup>Kang, 2010 (53)

### 8.3 ANEXO 3. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE DISTINTOS TIPOS DE PAN

*Tabla 4. Composición nutricional del pan blanco por 100 g de porción comestible*

<b>PAN BLANCO</b>			
<b>Agua (g)</b>	31	<b>Na (mg)</b>	540
<b>Energía (Kcal)</b>	258	<b>K (mg)</b>	100
<b>Proteínas (g)</b>	7,8	<b>Tiamina (mg)</b>	0,12
<b>Lípidos (g)</b>	1	<b>Riboflavina (mg)</b>	0,05
<b>AGS (g)</b>	0,2	<b>Equivalentes de niacina (mg)</b>	1,7
<b>AGM (g)</b>	0,13	<b>Vitamina B<sub>6</sub> (mg)</b>	0,04
<b>AGP (g)</b>	0,33	<b>Ácido fólico (µg)</b>	0
<b>Colesterol (mg)</b>	0	<b>Vitamina B<sub>12</sub> (µg)</b>	0
<b>Hidratos de carbono (g)</b>	58	<b>Ácido ascórbico (mg)</b>	0
<b>Fibra (g)</b>	2,2	<b>Vitamina A: Equivalentes de retinol (µg)</b>	0
<b>Ca (mg)</b>	19	<b>Retinol (µg)</b>	0
<b>Fe (mg)</b>	1,7	<b>Carotenos (µg)</b>	0
<b>I (mg)</b>	1	<b>Vitamina D (µg)</b>	0
<b>Mg (mg)</b>	26	<b>Vitamina E (mg)</b>	Tr
<b>Zn (mg)</b>	2		

Fuente: Moreiras, 2016 (21)

**Tabla 5.** Composición nutricional del pan integral por 100 g de porción comestible

<b>PAN INTEGRAL</b>			
<b>Agua (g)</b>	33,1	<b>Na (mg)</b>	540
<b>Energía (Kcal)</b>	228	<b>K (mg)</b>	220
<b>Proteínas (g)</b>	8	<b>Tiamina (mg)</b>	0,25
<b>Lípidos (g)</b>	1,4	<b>Riboflavina (mg)</b>	0,09
<b>AGS (g)</b>	0,25	<b>Equivalentes de niacina (mg)</b>	3,8
<b>AGM (g)</b>	0,19	<b>Vitamina B<sub>6</sub> (mg)</b>	0,14
<b>AGP (g)</b>	0,54	<b>Ácido fólico (µg)</b>	22
<b>Colesterol (mg)</b>	0	<b>Vitamina B<sub>12</sub> (µg)</b>	0
<b>Hidratos de carbono (g)</b>	49	<b>Ácido ascórbico (mg)</b>	0
<b>Fibra (g)</b>	8,5	<b>Vitamina A: Equivalentes de retinol (µg)</b>	0
<b>Ca (mg)</b>	21	<b>Retinol (µg)</b>	0
<b>Fe (mg)</b>	2,5	<b>Carotenos (µg)</b>	0
<b>I (mg)</b>	1	<b>Vitamina D (µg)</b>	0
<b>Mg (mg)</b>	91	<b>Vitamina E (mg)</b>	0,2
<b>Zn (mg)</b>	3,5		

Fuente: Moreiras, 2016 (21)



**Tabla 6.** Composición nutricional del pan de molde por 100 g de porción comestible

<b>PAN DE MOLDE</b>			
<b>Agua (g)</b>	32,3	<b>Na (mg)</b>	480
<b>Energía (Kcal)</b>	268	<b>K (mg)</b>	-
<b>Proteínas (g)</b>	8	<b>Tiamina (mg)</b>	-
<b>Lípidos (g)</b>	4,5	<b>Riboflavina (mg)</b>	-
<b>AGS (g)</b>	1	<b>Equivalentes de niacina (mg)</b>	-
<b>AGM (g)</b>	2	<b>Vitamina B<sub>6</sub> (mg)</b>	-
<b>AGP (g)</b>	1,4	<b>Ácido fólico (µg)</b>	-
<b>Colesterol (mg)</b>	Tr	<b>Vitamina B<sub>12</sub> (µg)</b>	-
<b>Hidratos de carbono (g)</b>	52	<b>Ácido ascórbico (mg)</b>	-
<b>Fibra (g)</b>	3,2	<b>Vitamina A: Equivalentes de retinol (µg)</b>	-
<b>Ca (mg)</b>	-	<b>Retinol (µg)</b>	-
<b>Fe (mg)</b>	-	<b>Carotenos (µg)</b>	-
<b>I (mg)</b>	-	<b>Vitamina D (µg)</b>	-
<b>Mg (mg)</b>	-	<b>Vitamina E (mg)</b>	-
<b>Zn (mg)</b>	-		

Fuente: Moreiras, 2016 (21)

## 8.4 ANEXO 4. DISEÑO EXPERIMENTAL

*Tabla 9. Diseño experimental para la toma de muestra*

	Artesanal 1		Artesanal 2		Industrial 1		Industrial 2	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
<b>Barra</b>	Miga	Miga	Miga	Miga	Miga	Miga	Miga	Miga
	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza
<b>Barra integral</b>	Miga	Miga	Miga	Miga	Miga	Miga	Miga	Miga
	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza
<b>Candéal</b>	Miga	Miga	Miga	Miga	Miga	Miga	Miga	Miga
	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza
<b>Pan de molde</b>	Miga	Miga	Miga	Miga	Miga	Miga	Miga	Miga
	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza	Corteza

Elaboración propia

## **8.5 ANEXO 5. PREPARACIÓN DE NaCl**

Se prepararon los reactivos previamente a la realización del ensayo. Para ello se utilizaron agua destilada, ácido nítrico, nitrato de plata y cloruro de sodio. Para la preparación del ácido nítrico se diluyeron 20 mL de ácido nítrico concentrado en 1 L de agua. Para la preparación del nitrato de plata se pesaron 14,541 g de nitrato de plata, se secaron durante 2 horas a  $150\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se enfriaron en un desecador. A continuación, se disolvieron en agua en un matraz volumétrico de 1 L hasta la marca correspondiente. Para la preparación del cloruro de sodio se pesaron 5 g de cloruro de sodio, se secaron durante 2 horas a  $110\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se dejaron enfriar en un desecador. A continuación, se disolvieron en agua en un matraz volumétrico de 1 L hasta la marca correspondiente.

Para la curva de titulación se pipetearon 25 mL de la solución de cloruro de sodio en un vaso de precipitado, se diluyó a 50 mL con el agua y se agregaron 50 mL del ácido nítrico diluido, preparado con anterioridad. Se introdujeron en la solución los electrodos y se agitó a velocidad constante. Se valoró con la solución de nitrato de plata preparada, agregando hasta un total de 50 mL de la misma para obtener una curva de titulación completa. Se determinó el punto de inflexión, que sería utilizado como punto final al hacer la valoración de la solución de muestra. A partir del volumen de la solución de nitrato de plata utilizada se calculó la concentración y se ajustó a 0,0856 mol/L.

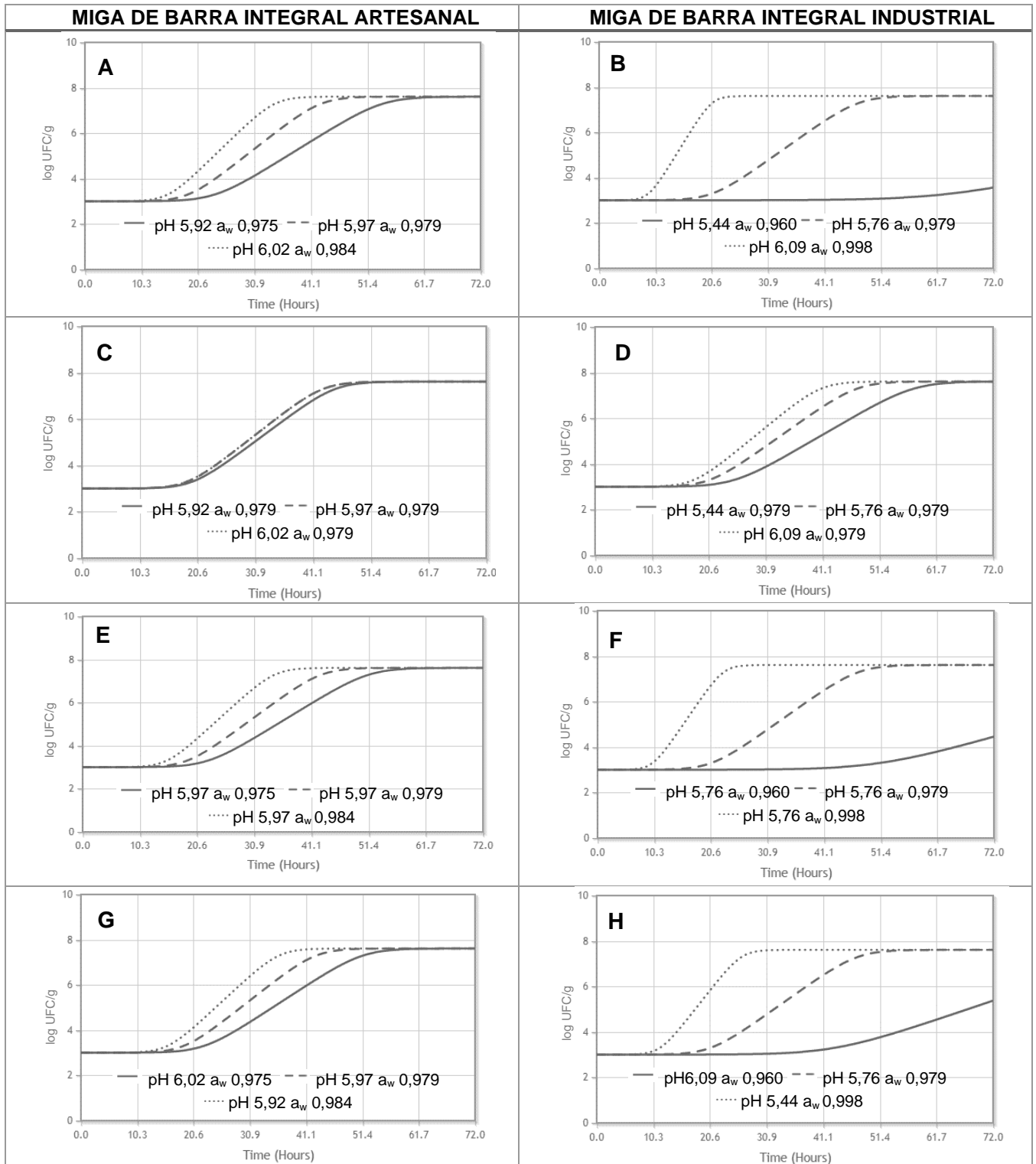
## 8.6 ANEXO 6. INGREDIENTES DE DIVERSOS PANES EN FUNCIÓN DEL ESTABLECIMIENTO ELABORADOR

Tabla 11. Ingredientes de los panes elaborados artesanal e industrialmente

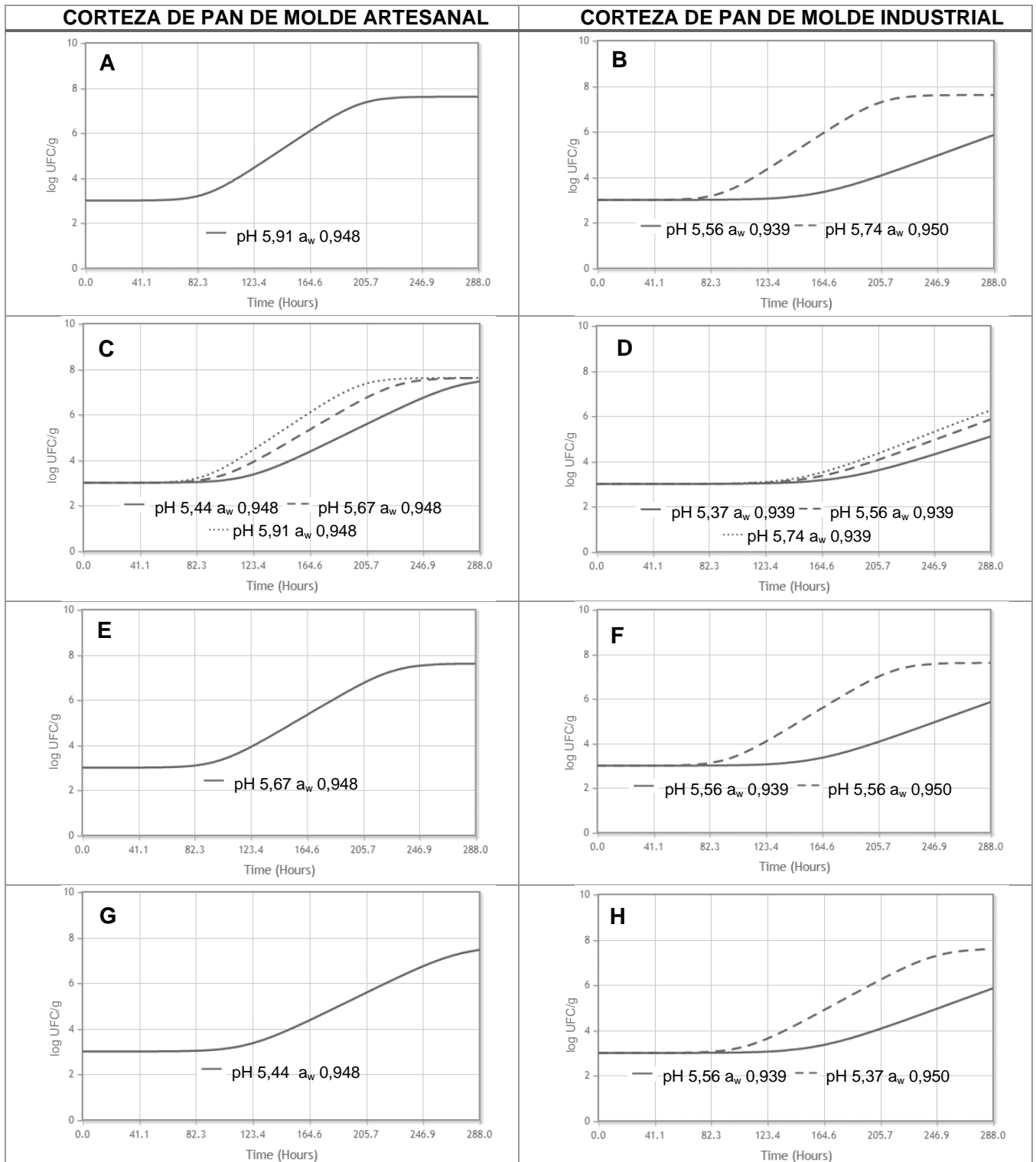
	ARTESANAL 1	ARTESANAL 2	INDUSTRIAL 1	INDUSTRIAL 2
<b>BARRA NORMAL</b>	Harina de trigo extracción 75%, agua, sal, levadura, extracto de malta	Harina de trigo, agua, levadura, sal	Harina de trigo, agua, levadura, sal, emulgente E-472e, antioxidante E-300	Harina de trigo, agua, levadura, sal, emulgente E-471, lecitina de soja, antiaglomerante E-170, antioxidante E-300, enzimas, masa madre
<b>BARRA INTEGRAL</b>	50% de harina integral de trigo ecológico molido de en molino piedra, 50% de harina de trigo de extracción 75%, agua levadura, sal	Harina de trigo integral, agua, levadura y sal	Harina de trigo integral, agua, sal, levadura	Harina de trigo, agua, harina integral de trigo (17%), salvado de trigo, levadura, sal, emulgente E-472E
<b>PAN CANDEAL</b>	<i>np</i>	Harina de trigo, agua, levadura, sal	Harina de trigo, agua, sal, levadura, masa madre de trigo inactiva, emulgente E-472e, antioxidante E-300	Harina de trigo, agua, levadura, sal marina, harina de leguminosas, emulsionante E-322, antiapelmazante E-170, antioxidante E-300, enzimas
<b>PAN DE MOLDE</b>	50% de harina integral de trigo ecológico molido de en molino piedra, 50% de harina de trigo de extracción 75%, agua levadura, sal	Harina de trigo, agua, mantequilla, azúcar, levadura, leche en polvo, sal, conservante E-282	Harina de trigo, agua, sal, levadura, aceite de girasol, mejorante panario (harina de trigo, conservador E-200, antioxidante E-300, masa madre de centeno inactiva (2%) y aroma) fibra de trigo, fibra de avena, fibra procedente de achicoria, conservador E-282	Harina de trigo, agua, sal, levadura, harina de centeno, mejorantes panarios (harina de centeno fermentada deshidratada, emulgente E-472e, antioxidante E-300, colorante E-170, harina de trigo, harina de trigo malteado, emulgentes E-471 y E-481 y enzimas)

*np*: no presentado. Elaboración propia

## 8.7 ANEXO 7. MODELIZACIONES DE CRECIMIENTO DE *B. CEREUS*



**Fig. 7.** Comparación del crecimiento de *B. cereus* en la miga de barra integral artesanal e industrial bajo distintas condiciones de pH y  $a_w$ , a temperatura de 24 °C. **A:** miga de barra integral artesanal a: — pH y  $a_w$  mínimo, - - pH y  $a_w$  medio, ..... pH y  $a_w$  máximo, **B:** miga de barra integral industrial a: — pH y  $a_w$  mínimo, - - pH y  $a_w$  medio, ..... pH y  $a_w$  máximo, **C:** miga de barra integral artesanal a una  $a_w$  media fija, — pH mínimo, - - pH medio, ..... pH máximo, **D:** miga de barra integral industrial a una  $a_w$  media fija, — pH mínimo, - - pH medio, ..... pH máximo, **E:** miga de barra integral artesanal a pH medio fijo, —  $a_w$  mínimo, - -  $a_w$  medio, .....  $a_w$  máximo, **F:** miga de barra integral industrial a pH medio fijo, —  $a_w$  mínimo, - -  $a_w$  medio, .....  $a_w$  máximo, **G:** miga de barra integral artesanal a: — pH máximo,  $a_w$  mínima, - - pH medio,  $a_w$  media, ..... pH mínimo,  $a_w$  máxima, **H:** miga de barra integral industrial a: — pH máximo,  $a_w$  mínima, - - pH medio,  $a_w$  media, ..... pH mínimo,  $a_w$  máxima. Valores de crecimiento en la Tabla 17 (Anexo 8).



**Fig. 10.** Comparación del crecimiento de *B. cereus* en la corteza de pan de molde artesanal e industrial bajo distintas condiciones de pH y  $a_w$ , a temperatura de 24 °C. **A:** corteza de pan de molde artesanal a: — pH y  $a_w$  máximo, **B:** corteza de pan de molde industrial a: — pH y  $a_w$  medio, - - pH y  $a_w$  máximo, **C:** corteza de pan de molde artesanal a una  $a_w$  máxima fija, — pH mínimo, - - pH medio, ..... pH máximo, **D:** corteza de pan de molde industrial a una  $a_w$  media fija, — pH mínimo, - - pH medio, ..... pH máximo, **E:** corteza de pan de molde artesanal a: — pH medio y  $a_w$  máximo, **F:** corteza de pan de molde industrial a pH medio fijo, —  $a_w$  medio, - -  $a_w$  máximo, **G:** corteza de pan de molde artesanal a: — pH mínimo,  $a_w$  máximo, **H:** corteza de pan de molde artesanal a: — pH medio,  $a_w$  medio, - - pH mínimo,  $a_w$  máximo. Valores de crecimiento en la Tabla 20 (Anexo 8).

## 8.8 ANEXO 8. DATOS DE CRECIMIENTO DE *B. CEREUS* BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE pH Y $a_w$

Tabla 16. Comparación de valores de crecimiento de *B. cereus* en la miga de barra artesanal e industrial bajo distintas condiciones de pH y  $a_w$ , a temperatura de 24 °C

	MIGA DE BARRA ARTESANAL					MIGA DE BARRA INDUSTRIAL				
	$a_w$	pH	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	TD (h)	$\lambda$ (h)	$a_w$	pH	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	TD (h)	$\lambda$ (h)
pH y $a_w$ mínimo	0.967	5.3	0.075	4.033	47.48	0.973	5.2	0.096	3.147	37.1
pH y $a_w$ medio	0.978	6	0.182	1.655	19.57	0.98	5.6	0.164	1.838	21.71
pH y $a_w$ máximo	0.991	6.8	0.437	0.689	8.15	0.987	6	0.268	1.123	13.29
$a_w$ medio y pH mínimo	0.978	5.3	0.129	2.34	27.61	0.98	5.2	0.135	2.231	26.38
pH y $a_w$ medio	0.978	6	0.182	1.655	19.57	0.98	5.6	0.164	1.838	21.71
$a_w$ medio y pH máximo	0.978	6.8	0.27	1.114	13.19	0.98	6	0.199	1.514	17.9
pH medio y $a_w$ mínimo	0.967	6	0.109	2.758	32.67	0.973	5.6	0.118	2.558	30.18
pH y $a_w$ medio	0.978	6	0.182	1.655	19.57	0.98	5.6	0.164	1.838	21.71
pH medio y $a_w$ máximo	0.991	6	0.313	0.962	11.38	0.987	5.6	0.224	1.342	15.9
pH máximo, $a_w$ mínimo	0.967	6.8	0.169	1.786	21.07	0.973	6	0.145	2.08	24.56
pH medio, $a_w$ medio	0.978	6	0.182	1.655	19.57	0.98	5.6	0.164	1.838	21.71
pH mínimo, $a_w$ máximo	0.991	5.3	0.234	1.289	15.22	0.987	5.2	0.188	1.604	18.94

$\mu_{max}$ : velocidad máxima de crecimiento. TD: tiempo de duplicación.  $\lambda$ : tiempo de latencia. Los valores de pH y  $a_w$  son medias, n=2.

**Tabla 17.** Comparación de valores de crecimiento de *B. cereus* en la miga de barra integral artesanal e industrial bajo distintas condiciones de pH y  $a_w$ , a temperatura de 24 °C

	MIGA DE BARRA INTEGRAL ARTESANAL					MIGA DE BARRA INTEGRAL INDUSTRIAL				
	$a_w$	pH	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	TD (h)	$\lambda$ (h)	$a_w$	pH	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	TD (h)	$\lambda$ (h)
<b>pH y <math>a_w</math> mínimo</b>	0.975	5.9	0.151	1.995	23.58	0.96	5.4	0.055	5.439	64.75
<b>pH y <math>a_w</math> medio</b>	0.979	6	0.19	1.582	18.74	0.979	5.8	0.172	1.745	20.7
<b>pH y <math>a_w</math> máximo</b>	0.984	6	0.237	1.272	15.03	0.998	6.1	0.396	0.761	8.99
<b><math>a_w</math> medio y pH mínimo</b>	0.979	5.9	0.181	1.662	19.68	0.979	5.4	0.142	2.123	25.08
<b>pH y <math>a_w</math> medio</b>	0.979	6	0.19	1.582	18.74	0.979	5.8	0.172	1.745	20.7
<b><math>a_w</math> medio y pH máximo</b>	0.979	6	0.19	1.582	18.74	0.979	6.1	0.2	1.507	17.81
<b>pH medio y <math>a_w</math> mínimo</b>	0.975	6	0.159	1.896	22.4	0.96	5.8	0.07	4.331	50.87
<b>pH y <math>a_w</math> medio</b>	0.979	6	0.19	1.582	18.74	0.979	5.8	0.172	1.745	20.7
<b>pH medio y <math>a_w</math> máximo</b>	0.984	6	0.237	1.272	15.03	0.998	5.8	0.357	0.844	9.98
<b>pH máximo, <math>a_w</math> mínimo</b>	0.975	6	0.159	1.896	22.4	0.96	6.1	0.082	3.651	43.43
<b>pH medio, <math>a_w</math> medio</b>	0.979	6	0.19	1.582	18.74	0.979	5.8	0.172	1.745	20.7
<b>pH mínimo, <math>a_w</math> máximo</b>	0.984	5.9	0.226	1.333	15.76	0.998	5.4	0.311	0.969	11.45

$\mu_{max}$ : velocidad máxima de crecimiento. TD: tiempo de duplicación.  $\lambda$ : tiempo de latencia. Los valores de pH y  $a_w$  son medias, n=2.



**Tabla 18.** Comparación de valores de crecimiento de *B. cereus* en la miga de pan candeal artesanal e industrial bajo distintas condiciones de pH y  $a_w$ , a temperatura de 24 °C

	MIGA DE PAN CANDEAL ARTESANAL					MIGA DE PAN CANDEAL INDUSTRIAL				
	$a_w$	pH	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	TD (h)	$\lambda$ (h)	$a_w$	pH	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	TD (h)	$\lambda$ (h)
<b>pH y <math>a_w</math> mínimo</b>	0.958	5.5	0.021	14.376	169.58	0.945	5.7	0.031	9.792	114.88
<b>pH y <math>a_w</math> medio</b>	0.967	5.7	0.093	3.246	38.29	0.959	5.9	0.07	4.297	50.87
<b>pH y <math>a_w</math> máximo</b>	0.977	5.9	0.165	1.82	21.58	0.975	6.2	0.176	1.713	20.23
<b><math>a_w</math> medio y pH mínimo</b>	0.967	5.5	0.083	3618	42.91	0.959	5.7	0.062	4.819	57.44
<b>pH y <math>a_w</math> medio</b>	0.967	5.7	0.093	3.246	38.29	0.959	5.9	0.07	4.297	50.87
<b><math>a_w</math> medio y pH máximo</b>	0.967	5.9	0.103	2.912	34.57	0.959	6.2	0.083	3.619	42.91
<b>pH medio y <math>a_w</math> mínimo</b>	0.958	5.7	0.059	5.066	60.36	0.945	5.9	0.035	8.651	101.75
<b>pH y <math>a_w</math> medio</b>	0.967	5.7	0.093	3.246	38.29	0.959	5.9	0.07	4.297	50.87
<b>pH medio y <math>a_w</math> máximo</b>	0.977	5.7	0.15	2011	23.74	0.975	5.9	0.151	1.995	23.58
<b>pH máximo, <math>a_w</math> mínimo</b>	0.958	5.9	0.067	4.514	53.15	0.945	6.2	0.042	7185	84.79
<b>pH medio, <math>a_w</math> medio</b>	0.967	5.7	0.093	3.246	38.29	0.959	5.9	0.07	4.297	50.87
<b>pH mínimo, <math>a_w</math> máximo</b>	0.977	5.5	0.135	2.223	26.38	0.975	5.7	0.136	2.209	26.19

$\mu_{max}$ : velocidad máxima de crecimiento. TD: tiempo de duplicación.  $\lambda$ : tiempo de latencia. Los valores de pH y  $a_w$  son medias, n=2.

**Tabla 19.** Comparación de valores de crecimiento de *B. cereus* en la miga de pan de molde artesanal e industrial bajo distintas condiciones de pH y  $a_w$ , a temperatura de 24 °C

	MIGA DE PAN DE MOLDE ARTESANAL					MIGA DE PAN DE MOLDE INDUSTRIAL				
	$a_w$	pH	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	TD (h)	$\lambda$ (h)	$a_w$	pH	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	TD (h)	$\lambda$ (h)
<b>pH y <math>a_w</math> mínimo</b>	0.958	5.3	0.047	6.38	75.77	0.945	5.3	0.024	12.544	148.38
<b>pH y <math>a_w</math> medio</b>	0.978	5.8	0.165	1.827	21.58	0.963	5.5	0.068	4.417	52.37
<b>pH y <math>a_w</math> máximo</b>	0.999	6.2	0.409	0.736	8.71	0.981	5.8	0.189	1.594	18.84
<b><math>a_w</math> medio y pH mínimo</b>	0.978	5.3	0.129	2.34	27.61	0.963	5.3	0.061	4.939	58.38
<b>pH y <math>a_w</math> medio</b>	0.978	5.8	0.165	1.827	21.58	0.963	5.5	0.068	4.417	52.37
<b><math>a_w</math> medio y pH máximo</b>	0.978	6.2	0.201	1.499	17.72	0.963	5.8	0.081	3.736	43.97
<b>pH medio y <math>a_w</math> mínimo</b>	0.958	5.8	0.063	4.782	56.53	0.945	5.5	0.027	11.083	131.9
<b>pH y <math>a_w</math> medio</b>	0.978	5.8	0.165	1.827	21.58	0.963	5.5	0.068	4.417	52.37
<b>pH medio y <math>a_w</math> máximo</b>	0.999	5.8	0.359	0.839	9.92	0.981	5.5	0.164	1.841	21.71
<b>pH máximo, <math>a_w</math> mínimo</b>	0.958	6.2	0.079	3.797	45.08	0.945	5.8	0.033	9204	107.92
<b>pH medio, <math>a_w</math> medio</b>	0.978	5.8	0.165	1.827	21.58	0.963	5.5	0.068	4.417	52.37
<b>pH mínimo, <math>a_w</math> máximo</b>	0.999	5.3	0.305	0.987	11.68	0.981	5.3	0.149	2.026	23.9

$\mu_{max}$ : velocidad máxima de crecimiento. TD: tiempo de duplicación.  $\lambda$ : tiempo de latencia. Los valores de pH y  $a_w$  son medias, n=2.

**Tabla 20.** Comparación de valores de crecimiento de *B. cereus* en la corteza de pan de molde artesanal a diferentes pH y  $a_w$  máxima; y en la corteza de pan de molde industrial a diferentes pH y  $a_w$  media y máxima, a temperatura de 24 °C

	CORTEZA DE PAN DE MOLDE ARTESANAL					CORTEZA DE PAN DE MOLDE INDUSTRIAL				
	$a_w$	pH	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	TD (h)	$\lambda$ (h)	$a_w$	pH	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	TD (h)	$\lambda$ (h)
<b>pH y <math>a_w</math> mínimo</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>pH y <math>a_w</math> medio</b>	-	-	-	-	-	0.94	5.6	0.022	13.493	161.87
<b>pH y <math>a_w</math> máximo</b>	0.948	5.9	0.04	7.435	89.03	0.95	5.7	0.04	7.586	89.03
<b><math>a_w</math> medio y pH mínimo</b>	0.948	5.4	0.03*	10.085*	118.71*	0.94	5.4	0.02	15.317	178.06
<b>pH y <math>a_w</math> medio</b>	0.948	5.7	0.036*	8.399*	98.92*	0.94	5.6	0.022	13.493	161.87
<b><math>a_w</math> medio y pH máximo</b>	0.948	5.9	0.04*	7.435*	89.03*	0.94	5.7	0.024	12.663	148.38
<b>pH medio y <math>a_w</math> mínimo</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>pH y <math>a_w</math> medio</b>	-	-	-	-	-	0.94	5.6	0.022	13.493	161.87
<b>pH medio y <math>a_w</math> máximo</b>	0.948	5.7	0.036	8.399	98.92	0.95	5.6	0.037	8.058	96.25
<b>pH máximo, <math>a_w</math> mínimo</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>pH medio, <math>a_w</math> medio</b>	-	-	-	-	-	0.94	5.6	0.022	13.493	161.87
<b>pH mínimo, <math>a_w</math> máximo</b>	0.948	5.4	0.03	10.085	118.71	0.95	5.4	0.033	9.091	107.92

$\mu_{max}$ : velocidad máxima de crecimiento. TD: tiempo de duplicación.  $\lambda$ : tiempo de latencia. -: datos de  $a_w$  insuficientemente elevado para introducirlo en la base de datos ComBase.

\*: utilización de  $a_w$  máximo por dato medio insuficientemente elevado para introducirlo en la base de datos ComBase. Los valores de pH y  $a_w$  son medias, n=2.

**Tabla 21.** Comparación del crecimiento de *B. cereus* entre la miga de los panes de molde artesanal 1 y artesanal 2, y comparación entre la miga de los panes de molde industrial 1 e industrial 2 bajo las mismas condiciones de pH y  $a_w$ , a temperatura de 24 °C

	MIGA DE PAN DE MOLDE ARTESANAL 1					MIGA DE PAN DE MOLDE ARTESANAL 2				
	$a_w$	pH	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	TD (h)	$\lambda$ (h)	$a_w$	pH	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	TD (h)	$\lambda$ (h)
<b>pH medio y <math>a_w</math> mínimo</b>	0.984	6.02	0.237	1.272	15.03	0.964	5.54	0.072	4.201	49.46
<b>pH y <math>a_w</math> medio</b>	0.990	6.02	0.302	0.998	11.79	0.968	5.54	0.087	3.443	40.93
<b>pH medio y <math>a_w</math> máximo</b>	0.996	6.02	0.368	0.819	9.68	0.973	5.54	0.101	2.97	35.26
	MIGA DE PAN DE MOLDE INDUSTRIAL 1					MIGA DE PAN DE MOLDE INDUSTRIAL 2				
	$a_w$	pH	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	TD (h)	$\lambda$ (h)	$a_w$	pH	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	TD (h)	$\lambda$ (h)
<b>pH medio y <math>a_w</math> mínimo</b>	0.968	5.66	0.097	3.091	36.71	0.945	5.42	0.026	11.791	136.97
<b>pH y <math>a_w</math> medio</b>	0.973	5.66	0.124	2.429	28.72	0.953	5.42	0.039	7.785	91.31
<b>pH medio y <math>a_w</math> máximo</b>	0.978	5.66	0.157	1.92	22.68	0.962	5.42	0.061	4.913	58.38

$\mu_{max}$ : velocidad máxima de crecimiento. TD: tiempo de duplicación.  $\lambda$ : tiempo de latencia. Los valores de pH y  $a_w$  son medias. Las variaciones de pH son muy pequeñas por lo que solo puede considerarse la media de pH para realizar las modelizaciones. No existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el crecimiento a pH medio y  $a_w$  mínima, pH y  $a_w$  medio, y pH medio y  $a_w$  máxima de ambos tipos de establecimientos (n=8) a través del análisis de *t-Student*.