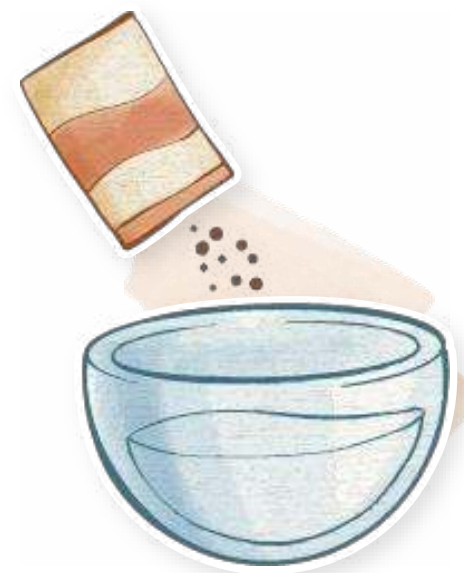


CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA DE LA MASA MADRE DEL CULTIVO EN SU ESTADO ÓPTIMO PARA ELABORACIÓN DE PAN ARTESANO



ALUMNADO
M. Fernandez, I. Roldán, B. Martos, P. Gomez
INVESTIGADORAS
Villafuerte-Jiménez, L., Márquez-Lema, A

IES MAIMÓNIDES



**IES
MAIMÓNIDES**



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS
4. PLANIFICACIÓN DE LAS SESIONES
5. MATERIAL Y MÉTODOS
6. RESULTADOS
7. CONCLUSIONES
8. AGRADECIMIENTOS
9. BIBLIOGRAFÍA

1. Introducción

EL **PAN**: COCCIÓN DE UNA MASA OBTENIDA POR LA MEZCLA DE **HARINA DE TRIGO Y AGUA**, CON O SIN SAL, FERMENTADA POR LEVADURAS DE PANIFICACIÓN O MASA MADRE.



LA MASA MADRE DE CULTIVO (MMC), ES UNA **MEZCLA DE HARINA Y AGUA** QUE SE DEJA **FERMENTAR** DURANTE VARIOS DÍAS, PERMITIENDO QUE LAS **BACTERIAS Y LEVADURAS** PRESENTES EN EL AMBIENTE SE DESARROLLEN Y CONVIERTAN LOS AZÚCARES DE LA HARINA EN **ÁCIDO LÁCTICO Y ALCOHOL**.



1. Introducción

BENEFICIOS DEL PAN ARTESANO ELABORADO A PARTIR DE MMC

- **MEJORA LA DIGESTIBILIDAD**: reducir los niveles de **gluten** en la harina
- **SABOR MÁS COMPLEJO**: sabor más profundo y complejo al pan debido a la presencia de **ácido láctico**, que mejora el sabor y la textura.
- **TEXTURA MEJORADA**: más esponjosa y aireada en el pan debido a la producción de **dióxido de carbono** durante la fermentación.
- **MAYOR DURABILIDAD**: vida útil más larga debido a la presencia de **ácido láctico** y otros compuestos antimicrobianos naturales.
- **MEJORA LA SALUD INTESTINAL**: **aumentar la biodisponibilidad** de ciertos nutrientes y mejorar la salud intestinal gracias a la presencia de **probióticos y otras bacterias beneficiosas**.

2. Fundamentos teóricos

LOS **MICROORGANISMOS** QUE SE ENCUENTRAN EN LAS MASAS MADRES FORMAN COMUNIDADES MICROBIANAS. DENTRO DE ESTE COMPLEJO MUNDO MICROBIANO, SE SUELEN PRODUCIR ASOCIACIONES ESTABLES ENTRE LAS **LEVADURAS** Y LAS **BAL** E INTERACCIONES ENTRE ELLAS. ESTAS ASOCIACIONES MICROBIANAS REFLEJAN LA CAPACIDAD METABÓLICA DE LAS DIFERENTES ESPECIES MICROBIANAS INVOLUCRADAS.

LEVADURAS	BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
<ul style="list-style-type: none">• Kazachstania exigua• Kazachstania barnetti• Saccharomyces cerevisiae• Candida humilis• Candida milleri	<ul style="list-style-type: none">• Fructilactobacillus sanfranciscensis• Fructilactobacillus plantarum• Fructilactobacillus alimentarius• Fructilactobacillus brevis

Microbiota presente en la Masa Madre de Cultivo (MMC) utilizada en el presente estudio



2. Fundamentos teóricos

FERMENTACIÓN EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE PAN

LEVADURAS
Y
BACTERIAS

Glucosa (azúcar)



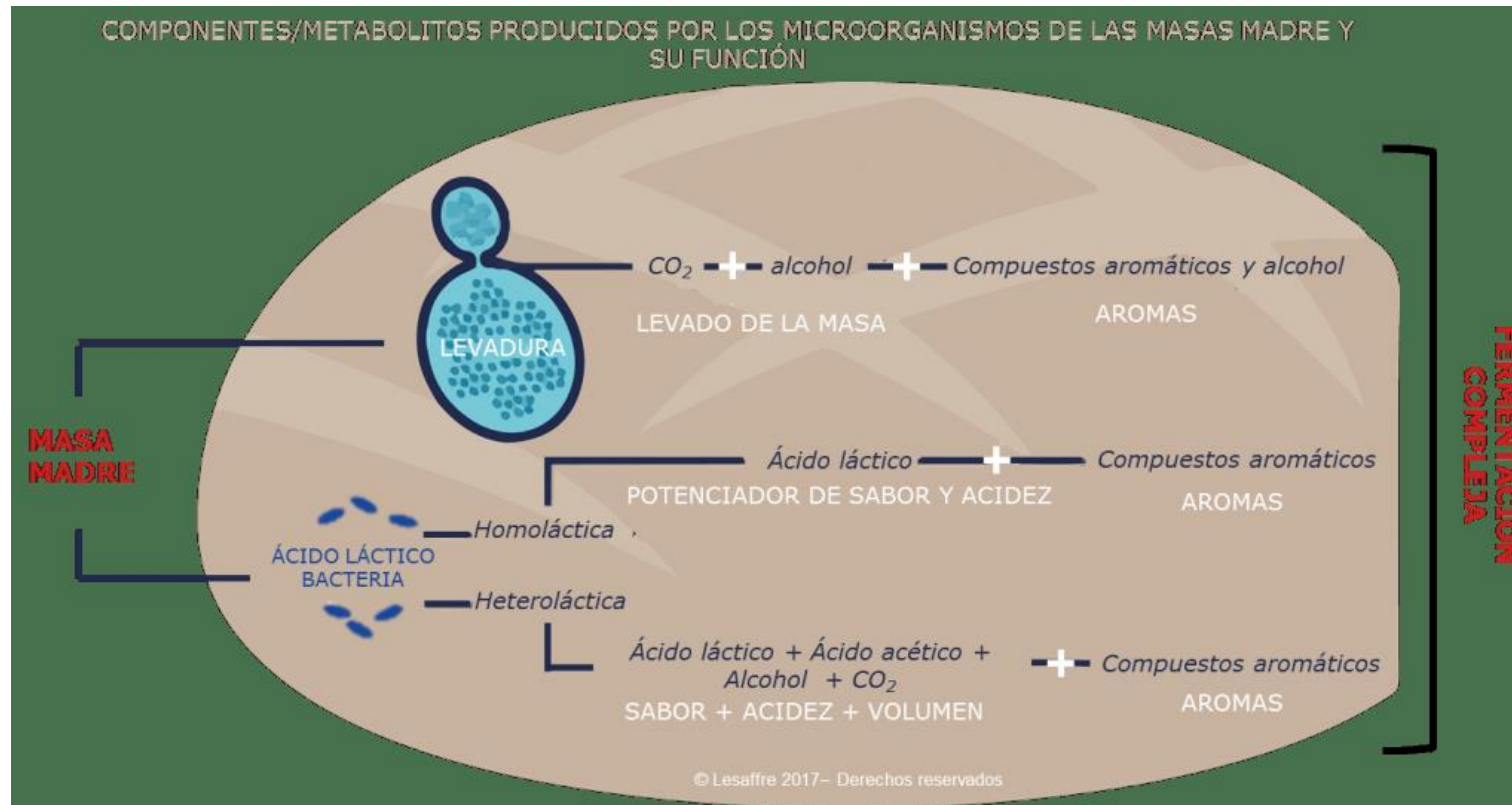
Energía + Dióxido de Carbono + Etanol (alcohol)



LA MASA DEL PAN AUMENTA SU VOLUMEN Y TIENE
UNA TEXTURA MÁS SUAVE



2. Fundamentos teóricos



FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Consiste en el consumo de los azúcares por parte de las levaduras y en la obtención del CO₂ y el etanol.

FERMENTACIÓN HOMOLÁCTICA

Se realiza por las BAL homofermentativas

FERMENTACIÓN HETEROLÁCTICA

Se lleva a cabo por las BAL heterofermentativas

3. Hipótesis y objetivos

- **ESTUDIO “IN VITRO” DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN DIFERENTES MMC (SÓLIDA Y LÍQUIDA) EN RELACIÓN A:**
 - ✓ **LAS PROPIEDADES SENSORIALES**
 - ✓ **EQUILIBRIO ÓPTIMO ENTRE LEVADURAS Y BAL**
 - ✓ **MEJORA DE PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DEL PAN ARTESANO ANALIZADO**
- **RECUENTO MICROBIOLÓGICO PRESENTE EN LAS DIFERENTES MMC ACTIVAS ANALIZADAS (SÓLIDA Y LÍQUIDA) A PARTIR DE DILUCIONES SERIADAS Y USANDO MEDIOS DE CULTIVOS ESPECÍFICOS.**
- **MEDIDA DE PH DE ESTAS MMC A FIN DE RELACIONAR SU ACIDEZ O BASICIDAD CON LA CANTIDAD Y TIPO DE MICROORGANISMO OBSERVADO EN ESTAS MUESTRAS.**

4. Planificación de las sesiones

1

- CONOCIMIENTOS **TEÓRICOS Y PRÁCTICOS** DE LAS TÉCNICAS DE **SIEMBRA Y RECuento**.
- **CUESTIONARIO** AUTOEVALUACIÓN **CONSUMO PAN** DE LOS ADOLESCENTES.

2

- RECOGIDA DE MUESTRAS DE MMC LÍQUIDA Y SÓLIDA. CONSERVACIÓN A 8°C.
- **PRIMER RECuento** CON TRES MEDIOS DE CULTIVO DISTINTOS Y SIETE DILUCIONES.

3

- RECOGIDA DE MUESTRAS DE MMC LÍQUIDA Y SÓLIDA. CONSERVACIÓN A 2°C Y A 8°C.
- **SEGUNDO RECuento** CON CINCO MEDIOS DE CULTIVO DISTINTOS Y CINCO DILUCIONES. HOMOGENEIZACIÓN MMC SÓLIDA.

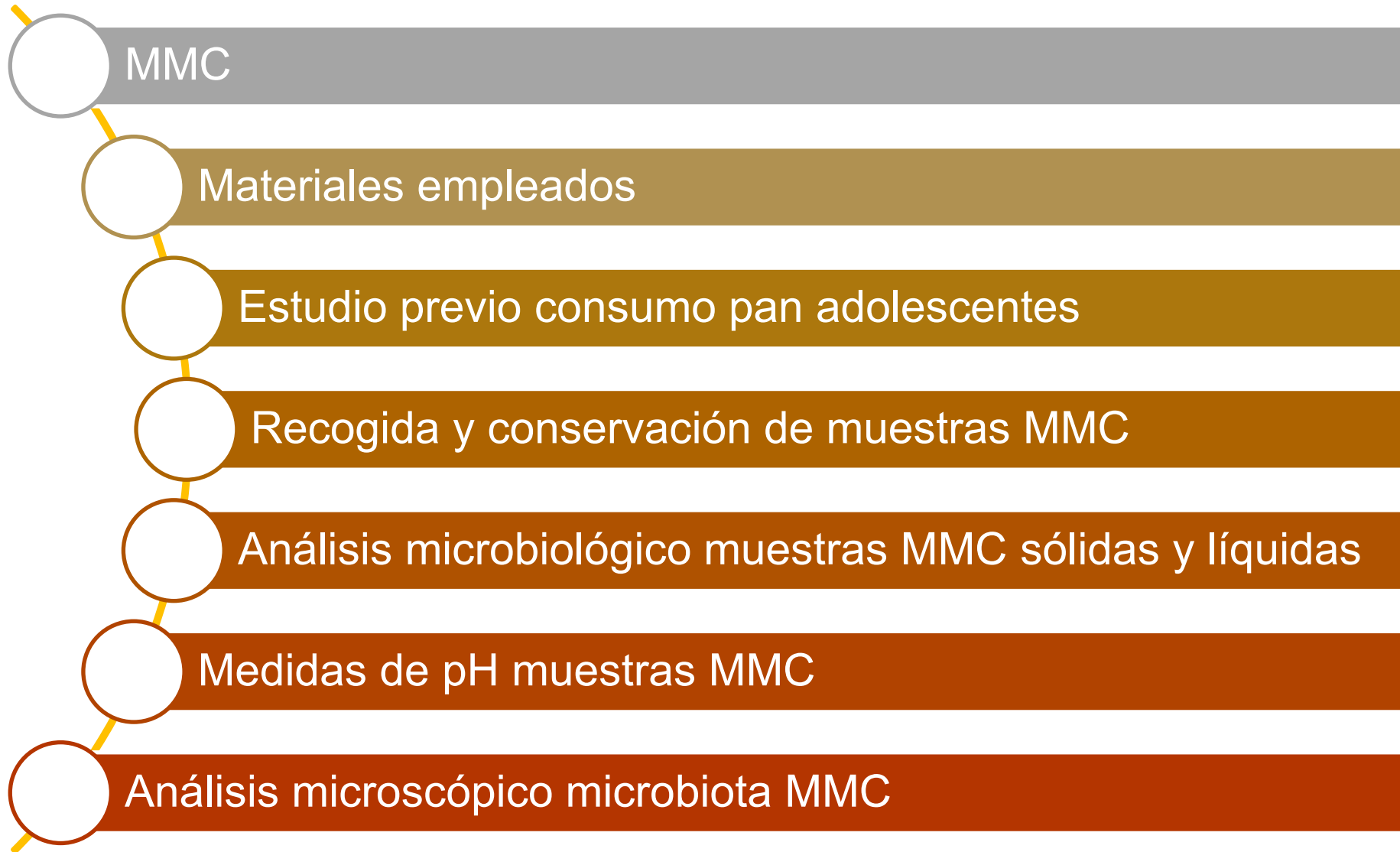
4

- RECOGIDA DE MUESTRAS DE MMC LÍQUIDA Y SÓLIDA. CONSERVACIÓN A 2°C Y A 8°C.
- **TERCER RECuento** CON DOS MEDIOS DE CULTIVO DISTINTOS Y CUATRO DILUCIONES. SIEMBRA EN PROFUNDIDAD CON DOBLE CAPA.

5

- ELABORACIÓN DE LA **DOCUMENTACIÓN**: PÓSTER CIENTÍFICO, MEMORIA DE INVESTIGACIÓN Y PRESENTACIÓN ORAL DE LOS RESULTADOS.

5. Material y métodos



5. Material y métodos: Materiales empleados

MMC PROCEDENTE DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN PANADERÍA Y BOLLERÍA ARTESANAL EN EL IES GRAN CAPITÁN

LA MMC ES **REFRESCADA** CON HARINA Y AGUA UN DÍA ANTES DE SU RECOGIDA, SIENDO LA PROPORCIÓN DISTINTA EN FUNCIÓN DEL TIPO QUE SE TRATE.

TIPO DE MMC	Proporción Agua/Harina
MMC sólida	1:1
MMC líquida	1:2



5. Material y métodos: **Materiales empleados**

MATERIALES Y EQUIPOS DE UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA EDUCATIVO

- **PH-METRO**
- **BALANZA GRANATARIA,**
- **CAMPANA DE FLUJO LAMINAR**
- **AUTOCLAVE**
- **VÓRTEX**
- **PLACA CALEFACTORA CON AGITADOR MAGNÉTICO**
- **ESTUFAS DE CULTIVO**
- **MICROONDAS**
- **MICROSCOPIOS**
- **MECHEROS**



- **ASAS DE SIEMBRA**
- **PLACAS DE PETRI**
- **ASAS DE DIGRASKY**
- **TUBOS DE ENSAYO**
- **GRADILLAS**
- **MATRACES ERLENMEYER**
- **ALGODÓN GRASO**
- **BOLSAS DE STOMACHER ESTÉRILES**
- **RECIPIENTES ESTÉRILES**
- **PINZAS METÁLICAS**
- **PINZAS DE MADERA**
- **PIPETAS PASTEUR**
- **MICROPIPETAS**
- **PUNTAS ESTÉRILES**
- **PORTAOBJETOS**
- **CUBREOBJETOS**
- **ALCOHOL ETÍLICO 96º**
- **AGUA DESTILADA**

5. Material y métodos: Materiales empleados

TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO SEGÚN LOS MICROORGANISMOS ANALIZADOS

LEVADURAS	BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)
SB (Agar Sabouraud) YEPD (Extracto de peptona 1%, Peptona 2%, Glucosa o dextrosa 2%, Agar 2%, agua doble destilada)	MRS (Man, Rogosa y Sharpe) MSA [Manitol 2,5%, Extracto de levadura 0,5%, Peptona 0,3%, Agar 2%, Cicloheximida (0,4g/L)] PCA (Plate Count Agar)



5. Material y métodos: Estudio previo consumo pan adolescentes

- **CUESTIONARIO ONLINE**
([HTTPS://FORMS.GLE/SNUZKVHOKJA6IF3T7](https://forms.gle/SNUZKVHOKJA6IF3T7))
- **21 PREGUNTAS** RELACIONADAS CON EL CONSUMO DE PAN.
- **100 ESTUDIANTES** DEL IES MAIMÓNIDES ELEGIDOS AL AZAR Y CON UN RANGO DE EDAD DE **12 A 18 AÑOS**.
- **ANÁLISIS DE RESULTADOS:** 1º BACHILLERATO DE ANATOMÍA APLICADA.



5. Material y métodos: **Recogida y conservación de muestras MMC**

- **ENVASE ESTÉRIL Y HERMÉTICO**
- **TRANSPORTE EN REFRIGERACIÓN (NEVERA PORTÁTIL)**
- **CONSERVACIÓN EN REFRIGERACIÓN (2°C Y/O 8°C)**



5. Material y métodos: Análisis microbiológico muestras MMC sólidas y líquidas

PRIMER RECUENTO

SEGUNDO RECUENTO

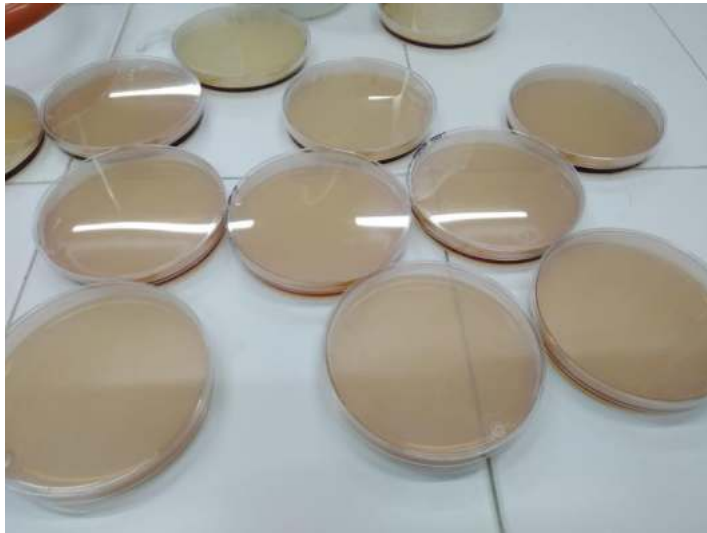
TERCER RECUENTO

MASA MADRE LÍQUIDA Y SÓLIDA

TEMPERATURAS 2°C Y 8°C

5 MEDIOS DE CULTIVOS

DE 3 A 7 DILUCIONES



5. Material y métodos: **Análisis microbiológico muestras MMC sólidas y líquidas**

- **HOMOGENEIZACIÓN EN STOMACHER.**
- **SOLUCIÓN MADRE: 25 g DE MMC (SÓLIDA O LÍQUIDA) EN 225 mL DE AGUA DE PEPTONA.**
- **DILUCIONES SERIADAS.**
- **SIEMBRAS (x 3).**
- **SIEMBRA POR EXTENSIÓN EN SUPERFICIE CON ASA DE DIGRASKY, 0,1 mL.**
- **EN EL TERCER RECuento SIEMBRA EN PROFUNDIDAD CON DOBLE CAPA, 1 mL.**

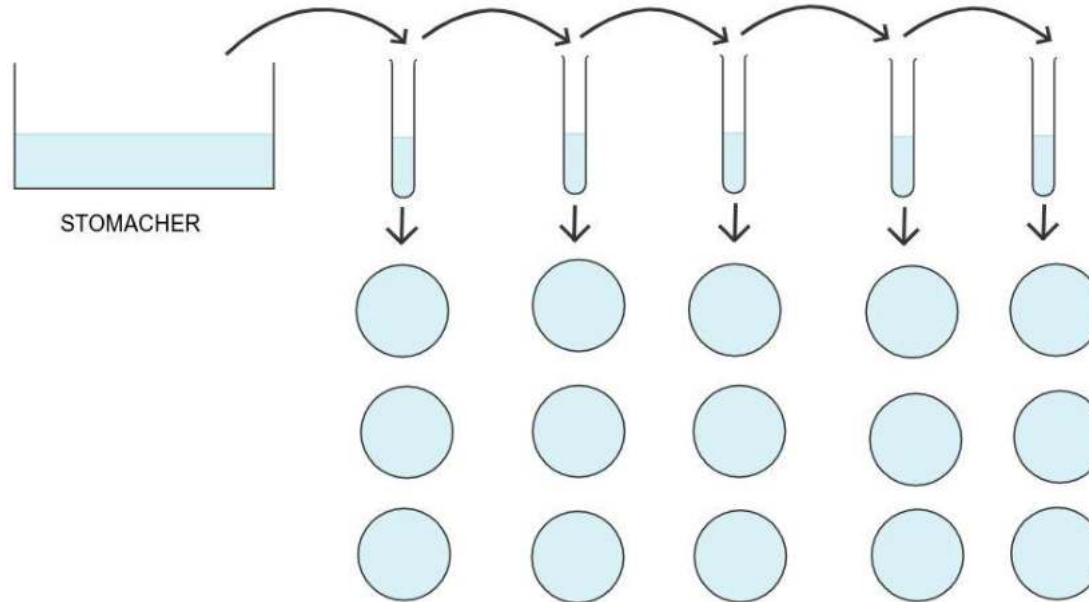


5. Material y métodos: Análisis microbiológico muestras MMC sólidas y líquidas



DILUCIONES DECIMALES SERIADAS

25 gramos de muestra
225 ml de agua de peptona



5. Material y métodos: Análisis microbiológico muestras MMC sólidas y líquidas

PRIMER RECUENTO

SE PRETENDE COMPROBAR EL RANGO DE DILUCIONES DE CRECIMIENTO MÁS ÓPTIMO PARA EL RECUENTO.

PRIMER RECUENTO MICROORGANISMOS							
MEDIO DE CULTIVO	DILUCIONES SERIADAS						
YEPD	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
SB	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
MRS	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}

SÓLO SE OBTIENE CRECIMIENTO EN LA MMC LÍQUIDA.

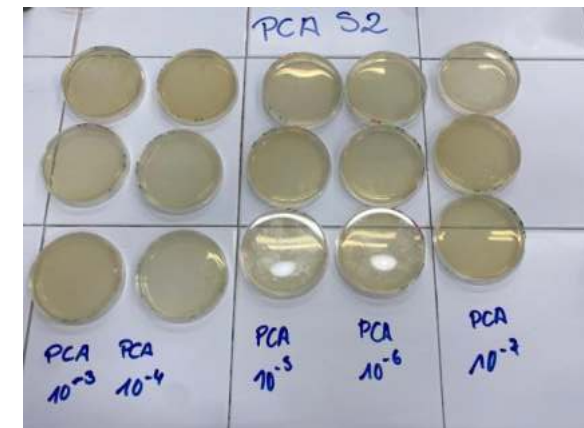
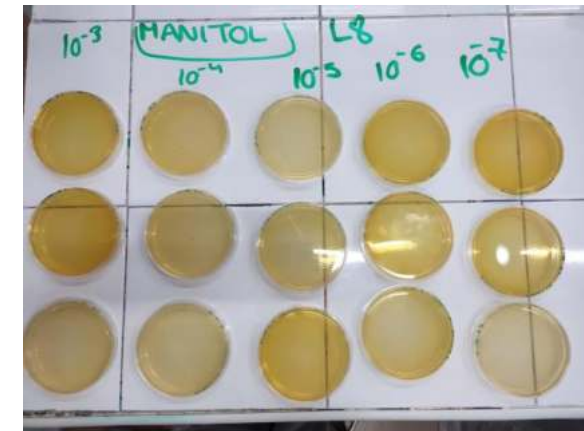
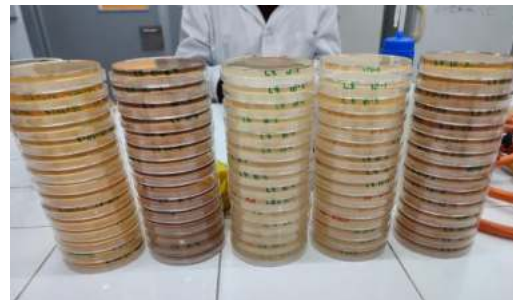
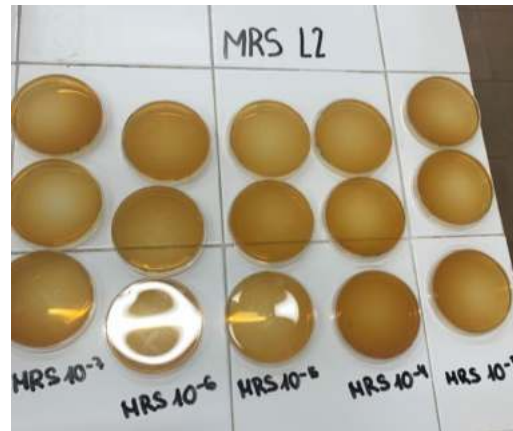


5. Material y métodos: Análisis microbiológico muestras MMC sólidas y líquidas

SEGUNDO RECuento

SE AMPLÍAN LOS MEDIOS DE CULTIVO Y SE LIMITAN LAS DILUCIONES A CINCO. SE CAMBIA LA HOMOGENEIZACIÓN DE LA MMC SÓLIDA.

SEGUNDO RECuento MICROORGANISMOS					
MEDIO DE CULTIVO	DILUCIONES SERIADAS				
YEPD	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
SB	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
MRS	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
MSA	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
PCA	10^{-3}	10^{-4} <td 10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	



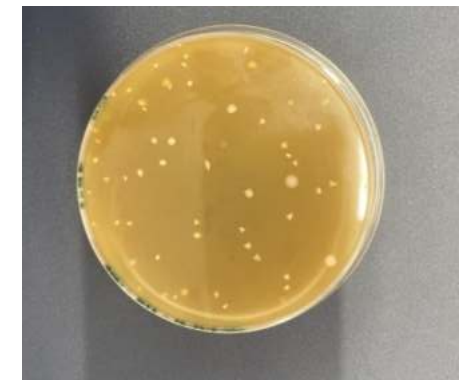
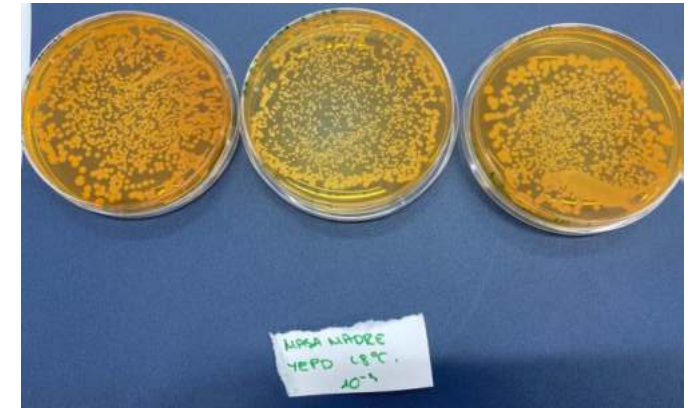
5. Material y métodos: Análisis microbiológico muestras MMC sólidas y líquidas

TERCER RECUENTO

SE ACOTAN LOS MEDIOS DE CULTIVO A ESTUDIAR Y SE REDUCEN LAS DILUCIONES.

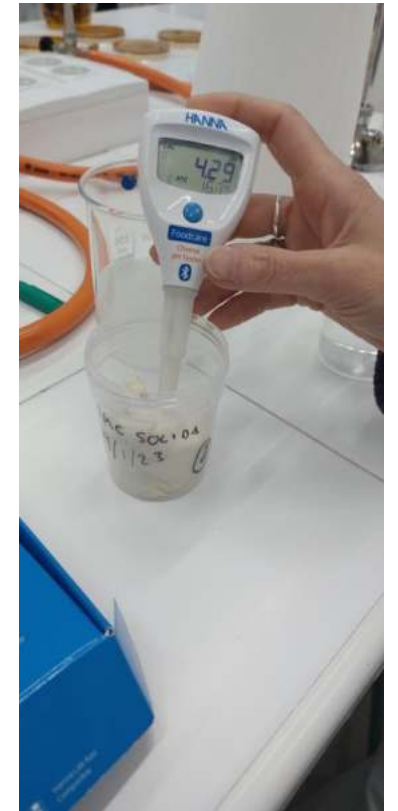
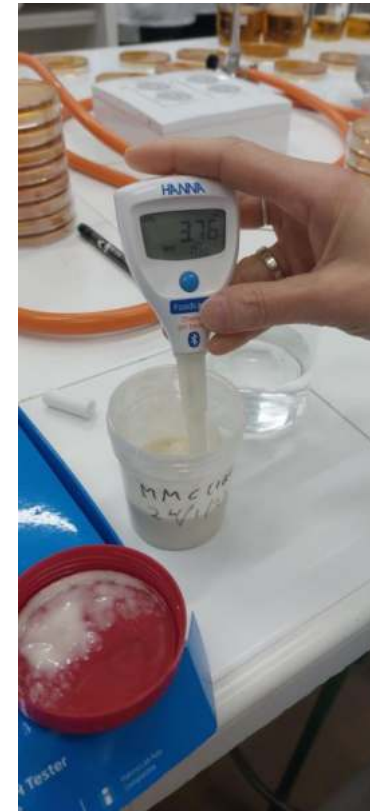
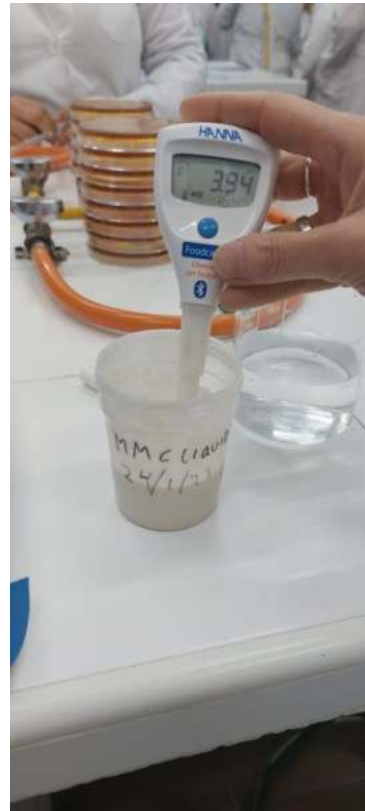
SE UTILIZA LA TÉCNICA DE SIEMBRA EN PROFUNDIDAD EN DOBLE CAPA PARA ANAEROBIOSIS.

TERCER RECUENTO MICROORGANISMOS				
MEDIO DE CULTIVO	DILUCIONES SERIADAS			
YEPD	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
MRS (doble capa)	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	



5. Material y métodos: **Medidas de pH** muestras MMC

- **ATEMPERAR MUESTRA.**
- **CALIBRAR** pH-METRO CON TAMPONES DE PH 4 Y PH 7.
- INTRODUCIR PUNTA DE **MEDICIÓN** DEL pH-METRO EN LA MASA MADRE 2 cm APROXIMADAMENTE.

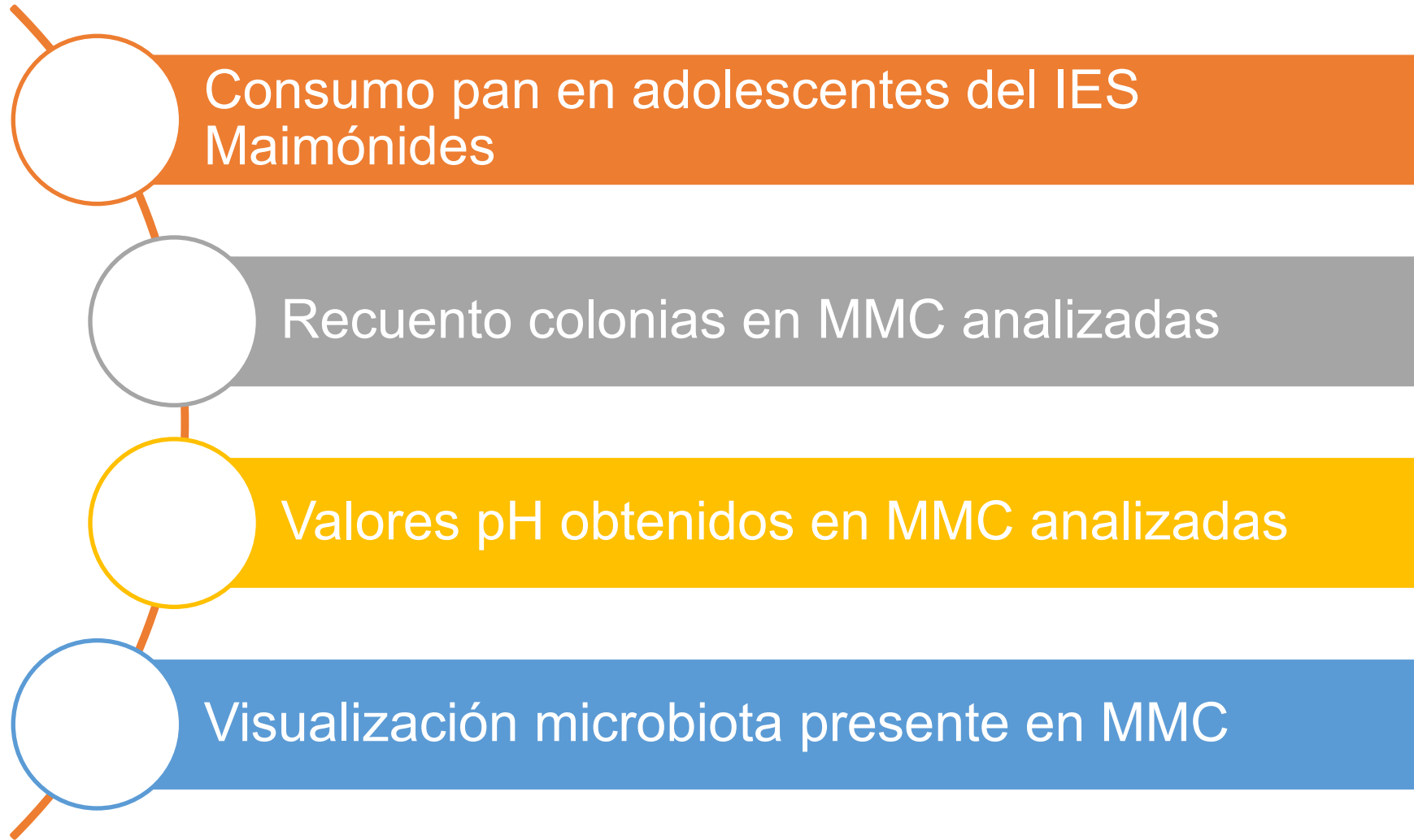


5. Material y métodos: **Análisis microscópico microbiota MMC**

- **COLONIAS** CRECIDAS EN MEDIO SB O YEDP QUE PRESENTARON **FORMA REDONDA, DE ASPECTO CREMOSO Y COLOR BLANQUECINO**
- **TINCIONES SIMPLES CON AZUL DE METILENO** AL 1% DE LAS COLONIAS AISLADAS



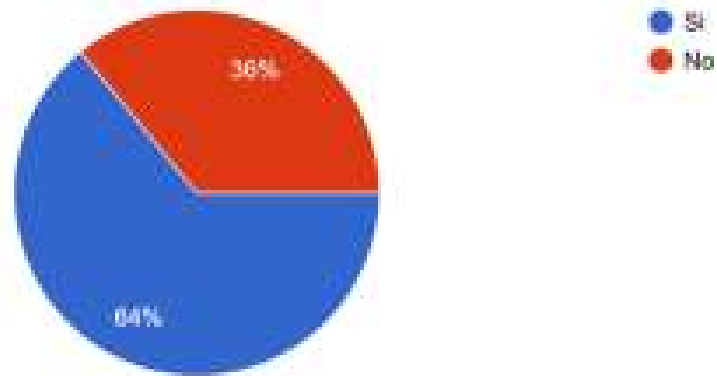
6. Resultados



6. Resultados: Consumo pan en adolescentes del IES Maimónides

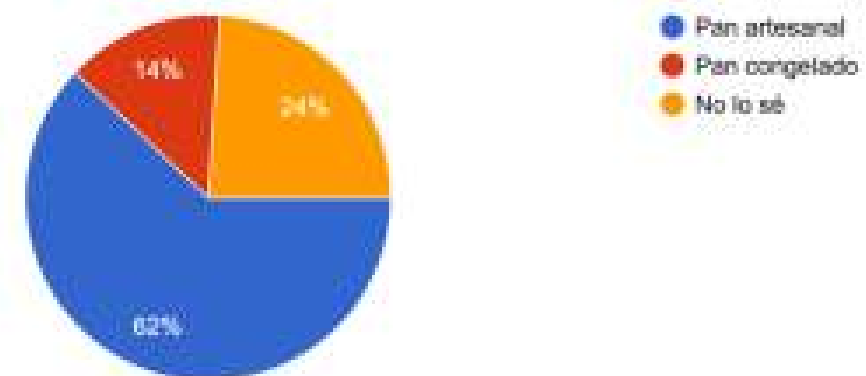
¿Le das importancia al hecho de que el pan esté recién hecho?

100 respuestas



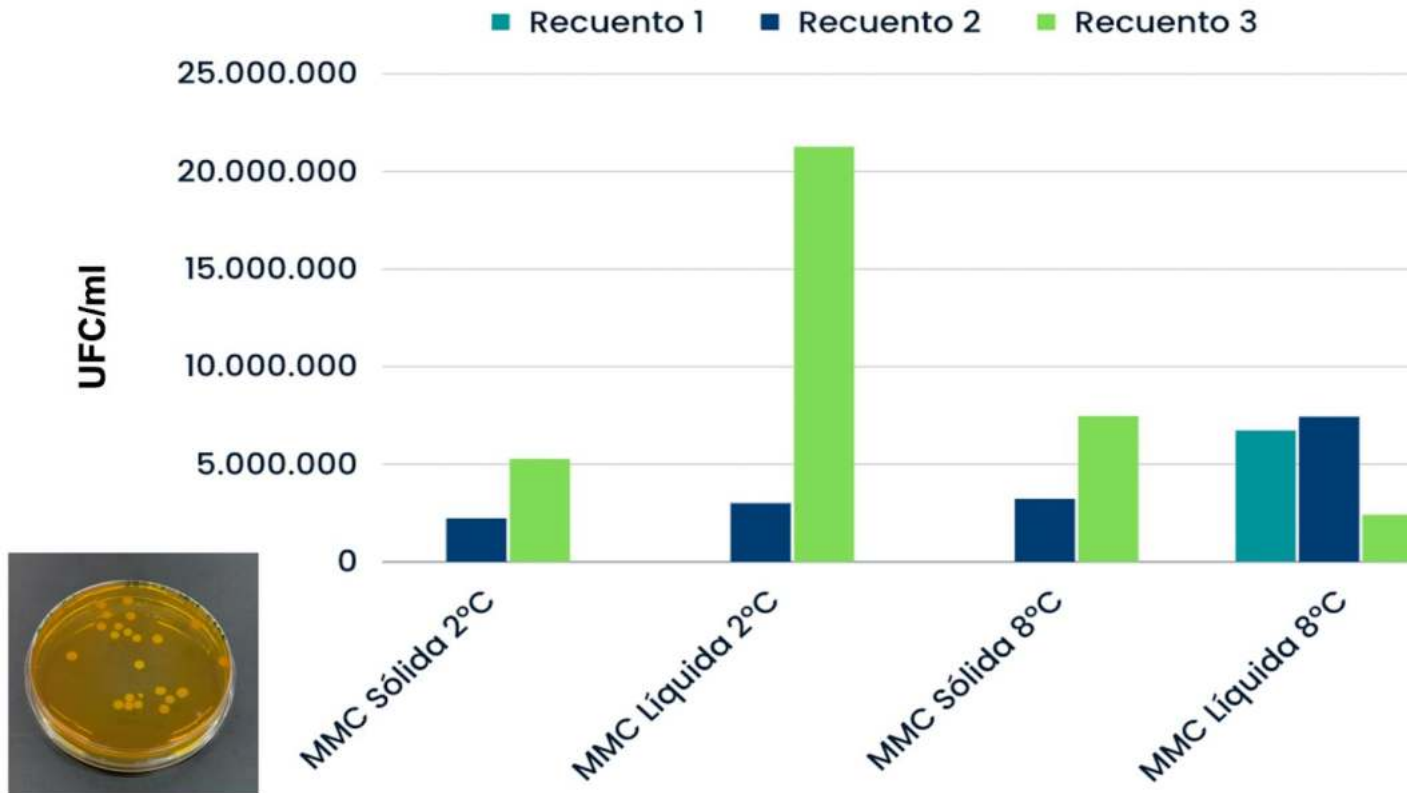
¿Qué tipo de pan compras?

100 respuestas



- EL 77% CONSUMÍA PAN DIARIAMENTE (DURANTE LA MERIENDA PRINCIPALMENTE)
- EL 64% CONOCE LO QUE ES LA MASA MADRE
- EL 75% CONSUME PAN CON GLUTEN FRENTE AL 25% QUE CONSUME PAN SIN GLUTEN

6. Resultados: Recuento colonias en MMC analizadas



PRIMER RECUENTO:

- **LEVADURAS SÓLO CRECEN EN MMC LÍQUIDA** (6,7.10⁶ UFC/ML A 8°C)

SEGUNDO RECUENTO:

- **MAYOR CRECIMIENTO DE LEVADURAS EN MMC A 8°C.**
- A 8°C (3,2. 10⁶ UFC/ML EN MMC SÓLIDA / 7.10⁶ UFC/ML EN LA MMC LÍQUIDA).
- A 2°C (2,2. 10⁶ UFC/ML EN LA MMC SÓLIDA / 3.10⁶ UFC/ML EN MMC LÍQUIDA).

TERCER RECUENTO:

- EN LAS **MMC SÓLIDAS EL CRECIMIENTO FUE MAYOR A 8°C** QUE A 2°C (7,4. 10⁶ UFC/ML FRENTE A 5,2. 10⁶ UFC/ML).
- EN LAS MMC LÍQUIDAS MAYOR CRECIMIENTO DE LEVADURAS A 2°C (21,2. 10⁶ UFC/ML) QUE A 8°C (2,4. 10⁶ UFC/ML). **RUPTURA DE LA CADENA DE FRÍO.**

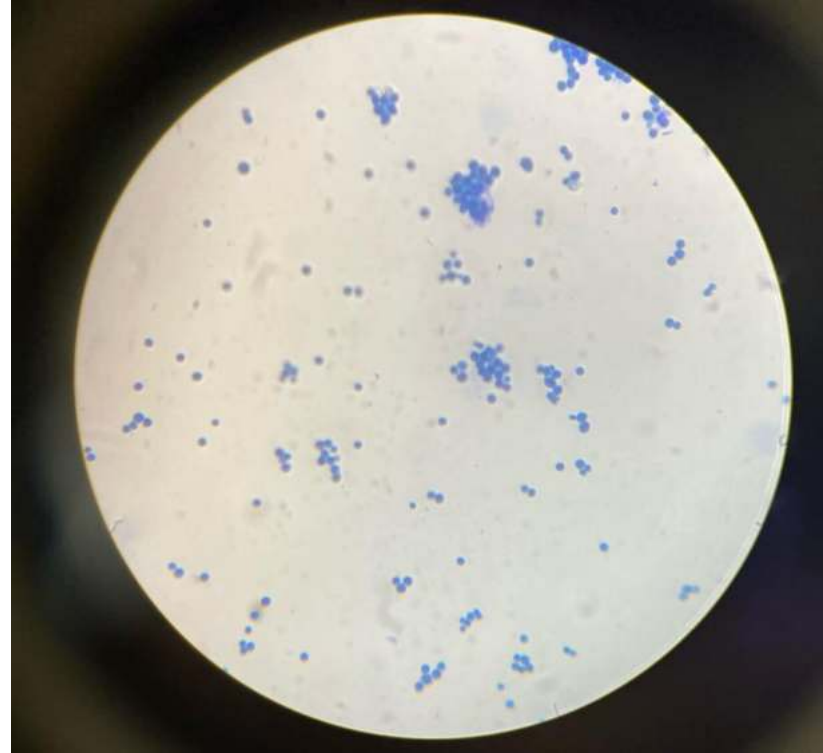
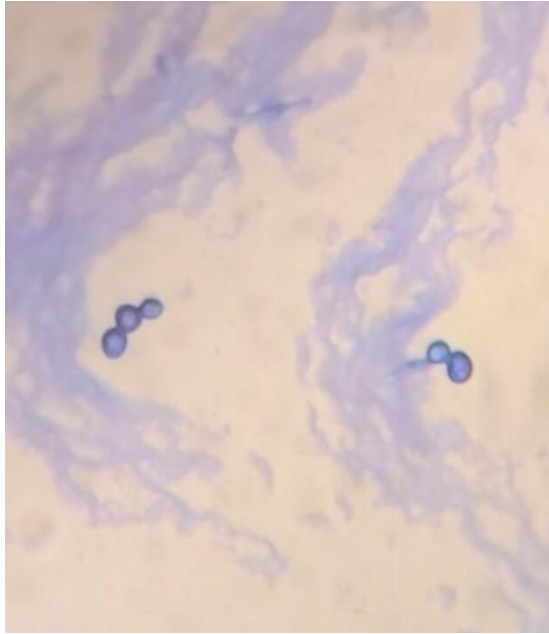
6. Resultados: Valores pH obtenidos en MMC analizadas

pH	MMC Sólida a 2°C	MMC líquida a 2°C	MMC Sólida a 8°C	MMC líquida a 8°C
25/01/2023	-	-	4,30	3,99
09/03/2023	3,72	3,92	3,89	3,68
13/04/2023	3,81	3,96	3,95	3,75

NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE EL PH MEDIDO EN LAS MUESTRAS MMC SÓLIDA Y MMC LÍQUIDA ANALIZADAS A 2°C Y 8°C, RESPECTIVAMENTE.

TODAS LAS MUESTRAS PRESENTARON UN **PH \leq 4 (ÁCIDO)**, DELATANDO LA PRESENCIA DE ÁCIDOS Y POR TANTO DE BACTERIAS.

6. Resultados: Visualización microbiota presente en MMC



**LEVADURAS POR SU ASPECTO REDONDEADO,
TAMAÑO, Y ALGUNAS DE ELLAS EN GEMACIÓN.**

7. Conclusiones

- LA POBLACIÓN DE ADOLESCENTES DEL IES MAIMÓNIDES, **APRECIA LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS** DEL PAN ARTESANO, PERO DESCONOCE LAS NUTRICIONALES.
- LA **ACIDEZ** DE LA MMC OSCILA ENTRE 3.68 Y 4.30 ENCONTRÁNDOSE **DENTRO DEL RANGO** DESCRITO POR RUPESH AND SHRADDHA (2011).
- **NO SE OBSERVÓ CRECIMIENTO BACTERIANO** EN LAS MMCs PERO LA ACIDEZ OBSERVADA Y LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL PAN RESULTANTE, DELATARÍA LA POCA PRESENCIA DE BACTERIAS BAL EN ESTAS MASAS ÁCIDAS.
- **MAYOR CRECIMIENTO DE LEVADURAS** EN LA MMC LÍQUIDA QUE EN LA MMC SÓLIDA.
- EL FACTOR TEMPERATURA INFLUYE EN EL CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS, OBSERVÁNDOSE **MAYOR CRECIMIENTO A 8°C**
- LA **RUPTURA DE LA CADENA DE FRÍO AFECTA** LA CONSERVACIÓN DE LAS MMC, YA QUE SE ALTERAN PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS. LA MMC LÍQUIDA SE VE MÁS AFECTADA QUE LA MMC SÓLIDA.

8. Agradecimientos

- **Nicolás Huertas Fuentes, profesor del Ciclo de especialización de Panadería y Bollería Artesanal**
- **Alumnado y profesorado CFGM Operaciones de Laboratorio**
- **Alumnado y profesorado 1º Bachillerato**
- **CEP – Red PERICLES**

9. Bibliografía

- Bernabé Marqués C.J., Llin Albiñana M.L., Pérez Lacueva C. (2007). La masa madre: el secreto del pan. *Alimentaria* 2007: 42-46
- Corsetti, A. (2013). Technology of Sourdough Fermentation and Sourdough Applications”. En: Gobbetti, M., y Gänzle, M. (Coord.). *Handbook on Sourdough Biotechnology*. New York: Springer Science-Bussines Media.
- Pauline P, Gaëlle A, Joëlle GP, Dorothée C, Catherine F, Le BA, Carole P, et al. (2008) Influence of formulation and process on the aromatic profile and physical characteristics of bread. *J Cereal Sci.* 2008;48(3):686–697.
- Gobetti M (1998). The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts (1998) *Trends Food Sci. Technol.*, 9 (1998), pp. 267-274 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224498000533?via%3Dihub>)
- Gobbetti, M., Gänzle, M., al., E., 2013. *Handbook on Sourdough Biotechnology*. 1 - 285.
- Li Z, Li H, Deng C, Bian K, Liu C (2014) Effect of *Lactobacillus plantarum* DM616 on dough fermentation and Chinese steamed bread quality. *J Food Process Preserv.* 2014;39(1):30–37. doi: 10.1111/jfpp.12205
- Luangsakul N, Keeratipibul S, Jindamorakot S, Tanasupawat S. (2009) Lactic acid bacteria and yeasts isolated from the starter doughs for Chinese steamed buns in thailand. *LWT Food Sci Technol.* 2009;42(8):1404–1412. doi: 10.1016/j.lwt.2009.03.007
- Madigan M. (2009). *Brock, biología de los microorganismos*. Talca-México Pearson Educación.
- Wu C, Liu R, Huang W, Rayas-Duarte P, Wang F, Yao Y. (2012) Effect of sourdough fermentation on the quality of Chinese Northern-style steamed breads. *J Cereal Sci.* 2012;56(2):127–133. doi: 10.1016/j.jcs.2012.03.007.
- <https://www.lesaffre.es/>

**GRACIAS POR SU
ATENCIÓN**