

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

## ALUMNADO

M. Fernández<sup>1</sup>, I. Roldán<sup>1</sup>, B. Martos<sup>1</sup>, P. Gómez<sup>1</sup>

## INVESTIGADORES

Villafuerte-Jiménez, L<sup>1</sup>., Márquez-Lema, A<sup>1</sup>.

## CENTRO

1.IES Maimónides (Córdoba)

Curso 2022/2023

Abril de 2023





## INDEX

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
3.1. Propiedades del pan artesano con Masa Madre de Cultivo (MMC) ....	4
3.2. Microbiota presente en la Masa Madre de Cultivo (MMC) .....	5
3.3. La fermentación en panadería .....	7
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
4.1. Masa Madre de Cultivo (MMC) .....	8
4.2. Materiales empleados.....	9
4.3. Planificación de las sesiones.....	9
4.4. Estudio previo sobre consumo pan en adolescentes.....	10
4.5. Recogida y conservación de muestras MMC.....	11
4.6. Análisis microbiológico de MMC sólidas y líquidas.....	11
4.7. Medidas pH en muestras MMC .....	13
4.8. Análisis microscópico microbiota MMC.....	13
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>14</b>
5.1. Consumo pan en adolescentes del IES Maimónides.....	14
5.2. Recuento colonias en MMC analizadas.....	14
5.3. Valores pH obtenidos en las MMC analizadas.....	15
5.4. Visualización microbiota presente en MMC.....	16

<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>17</b>
<b>7. AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>17</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>18</b>

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

Fernández-Alcaide, M., Roldán-Caballero, I., Martos-Ansino, B., Gómez-Sinoga, P., Villafuerte-Jiménez, L., Márquez-Lema, A.

### **RESUMEN**

La masa madre de cultivo (MMC) se define según el Real Decreto 308/2019 como “la masa activa compuesta por harina de trigo o de otro cereal, o mezclas de ellas, y agua, con o sin adición de sal, sometida a una fermentación espontánea acidificante cuya función es asegurar la fermentación de la masa de pan. La masa madre contiene una microbiota que realiza la fermentación acidificante y alcohólica constituida esencialmente por bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras salvajes”. El uso de MMC en la elaboración del pan, hace que éste adquiera una mejor calidad organoléptica y nutritiva, así como una mayor vida útil en comparación con el resto de panes convencionales. Sin embargo, se desconoce en gran medida como los microorganismos procariontes y eucariontes presentes en estas MMC, actúan e interaccionan para conseguir panes y otros productos panaderos con las mejores propiedades nutritivas y funcionales. El objetivo del presente trabajo ha sido el estudio “in vitro” de la microbiota presente en diferentes MMC (sólida y líquida) en relación a las propiedades sensoriales observadas en los panes artesanos obtenidos, con el fin de identificar el equilibrio óptimo entre levaduras y BAL que determinen las mejores propiedades organolépticas del pan artesano analizado. Para ello, se realizó el recuento microbiológico presente en las diferentes MMC activas analizadas (sólida y líquida) a partir de diluciones seriadas y usando medios de cultivos específicos. Asimismo, se midió el pH de estas MMC a fin de relacionar su acidez o basicidad con la cantidad y tipo de microorganismo observado en estas muestras.

Palabras claves: *Masa Madre de Cultivo (MMC), microbiota, calidad organoléptica*

## CHARACTERIZATION OF THE MICROBIOTA OF THE SOURDOUGH STARTER IN ITS OPTIMAL STATE FOR ARTISAN BREAD MAKING

Fernández-Alcaide, M., Roldán-Caballero, I., Martos-Ansino, B., Gómez-Sinoga, P., Villafuerte-Jiménez, L., Márquez-Lema, A.

### ABSTRACT

Sourdough starter (SDS) is defined according to Royal Decree 308/2019 as 'the active dough composed of wheat flour or other cereal flour, or mixtures thereof, and water, with or without added salt, subjected to spontaneous acidifying fermentation whose function is to ensure the fermentation of bread dough. The sourdough starter contains a microbiota that carries out the acidifying and alcoholic fermentation, consisting mainly of lactic acid bacteria (LAB) and wild yeasts.' The use of SDS in bread making results in improved organoleptic and nutritional quality, as well as extended shelf life compared to conventional breads. However, the specific actions and interactions of prokaryotic and eukaryotic microorganisms present in these SDS are largely unknown in how they contribute to bread and other bakery products with the best nutritional and functional properties. The objective of this study was to investigate the *in vitro* microbiota present in different types of SDS (solid and liquid) in relation to the sensory properties observed in the artisanal breads obtained, in order to identify the optimal balance between yeasts and LAB that determine the best organoleptic properties of the analyzed artisanal bread. For this purpose, microbiological counts were performed on the different active SDS samples analyzed (solid and liquid) using serial dilutions and specific culture media. Additionally, the pH of these SDS samples was measured to correlate acidity or alkalinity with the quantity and type of microorganism observed in these samples.

Keywords: *Sourdough starter (SDS), microbiota, organoleptic quality*

## 1. INTRODUCCIÓN

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 medio ambiente se desarrollen y conviertan los azúcares de la harina en ácido láctico y alcohol. Esta masa madre fermentada se utiliza para hacer pan y otros productos horneados.

Durante siglos se ha utilizado la MMC como método de fermentación natural en la elaboración de pan, y su uso ha experimentado un resurgimiento en popularidad en los últimos años debido a su sabor único y beneficios para la salud del consumidor en comparación con la producción del pan industrial. Entre los beneficios del pan artesano elaborado a partir de MMC, destacan:

1. **Mejora la digestibilidad:** La masa madre fermentada naturalmente puede reducir los niveles de gluten en la harina y hacer que el pan sea más fácil de digerir para algunas personas con sensibilidad al gluten.
2. **Sabor más complejo:** La fermentación natural de la masa madre agrega un sabor más profundo y complejo al pan debido a la presencia de ácido láctico, que mejora el sabor y la textura.
3. **Textura mejorada:** La masa madre ayuda a crear una textura más esponjosa y aireada en el pan debido a la producción de dióxido de carbono durante la fermentación.
4. **Mayor durabilidad:** El pan elaborado con masa madre suele tener una vida útil más larga que el pan hecho con levadura comercial debido a la presencia de ácido láctico y otros compuestos antimicrobianos naturales.
5. **Mejora la salud intestinal:** La fermentación natural de la masa madre puede aumentar la biodisponibilidad de ciertos nutrientes y mejorar la salud intestinal gracias a la presencia de probióticos y otras bacterias beneficiosas.

Sin embargo, el proceso de elaboración lleva mucho más tiempo y es más complicado que la producción del pan industrial, pues la calidad de la MMC puede verse afectada por el tiempo y las condiciones de almacenamiento (*Gobetti 1998; Gobetti et al., 2013*).

En el presente trabajo de investigación se ha realizado el estudio microbiológico “in vitro” de diferentes MMC (sólida y líquida) bajo diferentes temperaturas de almacenamiento (2°C y 8°C) con el fin de identificar el equilibrio óptimo de la microbiota presente en estas MMC con las mejores propiedades organolépticas del pan artesano resultante.

## **2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

Atendiendo a los resultados publicados por otros autores (*Gobetti 1998; Gobetti et al., 2013*), se sugiere que las características específicas de la masa madre vienen determinadas por la interacción de manera sinérgica entre las BAL y las levaduras. Sin embargo, se desconoce la proporción de estos microorganismos en MMC sólidas y líquidas sometidas a diferentes temperaturas de conservación (2°C y 8°C) y su relación con las propiedades óptimas en el pan resultante.

Por lo tanto, el objetivo principal de esta investigación será analizar “in vitro” la presencia de microorganismos procariotas (BAL) y eucariotas (levaduras) presentes en MMC sólidas y líquidas conservadas a 2°C y 8°C, con el fin de seleccionar las condiciones más óptimas en la elaboración de panes artesanos con las mejores propiedades organolépticas en el Ciclo de Especialización de Panadería y Bollería Artesana del IES Gran Capitán. Y a su vez, corroborar las características organolépticas apreciadas por el experto panadero, con la proporción de microorganismos presentes en la masa madre.

Otros objetivos alcanzados en este proyecto son:

- Fomentar hábitos saludables en nuestro alumnado.
- Desarrollar una investigación desde la hipótesis hasta el resultado final.
- Aprender a realizar diluciones seriadas y cultivos microbiológicos.
- Realización de recuentos de microorganismos.
- Profundizar en el análisis microbiológico de productos fermentados
- Analizar los resultados obtenidos

## **3. MARCO TEÓRICO**

### *3.1.- Propiedades del pan artesano con Masa Madre de Cultivo (MMC)*

El pan artesano elaborado con masa madre de cultivo (MMC) es un tipo de pan que se elabora de manera tradicional utilizando una mezcla de harina, agua y una masa madre hecha de bacterias y levaduras naturales presentes en el ambiente y en los ingredientes utilizados (*Bernabé et al., 2007*).



A diferencia del pan industrial que se hace con levadura química, el pan artesano con MMC tiene un proceso de fermentación más lento, lo que le da un sabor y aroma únicos. Además, la masa madre natural hace que el pan sea más fácil de digerir, ya que ayuda a descomponer los carbohidratos y las proteínas en el pan.

El consumo de pan artesano elaborado con MMC tiene varios beneficios para la salud. Por un lado, es una fuente de carbohidratos complejos que proporcionan energía sostenible y son menos propensos a aumentar los niveles de azúcar en la sangre. También es una fuente de fibra dietética, que puede mejorar la salud digestiva y prevenir enfermedades como la diabetes, la obesidad y el cáncer de colon.

Además, el pan artesano con MMC contiene una variedad de vitaminas y minerales, incluyendo hierro, calcio y vitaminas B, que son esenciales para el funcionamiento adecuado del cuerpo. También es bajo en grasas y colesterol, lo que lo convierte en una opción saludable para aquellos que buscan mantener una dieta equilibrada.

En resumen, el consumo de pan artesano elaborado con masa madre natural es una excelente opción para aquellos que buscan una alternativa más saludable y nutritiva al pan industrial. Además de tener un sabor y aroma deliciosos, el pan con MMN también tiene varios beneficios para la salud que lo convierten en una excelente opción para cualquier dieta equilibrada.

### *3.2.- Microbiota presente en la Masa Madre de Cultivo (MMC)*

La masa madre de cultivo (MMC) es una mezcla de harina y agua que se fermenta gracias a la presencia de microorganismos vivos, incluyendo bacterias y levaduras. Estos microorganismos son los responsables de crear las propiedades organolépticas únicas del pan resultante, incluyendo su aroma, sabor y textura (Bernabé 2007).

La microbiota presente en esta MMC es muy importante para el proceso de fermentación y para las características finales del pan resultante. Las bacterias (microorganismos procariontes) presentes en la MMC producen ácido láctico y ácido acético, que contribuyen al sabor ácido y a la textura suave del pan. Mientras que las levaduras (microorganismos eucariotes) presentes en la MMC producen dióxido de carbono, que ayuda a que el pan se levante y tenga una textura esponjosa (véase Figura 1).



**Figura 1.- Metabolitos producidos por la microbiota presente en la Masa Madre de Cultivo (MMC) y su función en el pan artesano resultante. Imagen de Lessaffre 2017 (<https://www.lesaffre.es>).**

Además de contribuir a las propiedades organolépticas del pan, la microbiota presente en la MMC también tiene beneficios para la salud. Estos microorganismos son probióticos naturales, que ayudan a mantener un equilibrio saludable de bacterias en nuestro tracto digestivo. También se ha demostrado que la presencia de bacterias lácticas en la MMC reduce el contenido de gluten del pan, lo que lo hace más fácil de digerir para aquellas personas con sensibilidad al gluten.

Así mismo, los microorganismos procariontes (bacterias) y eucariotes (levaduras) que se encuentran en las MMC (ver Tabla 1) forman comunidades microbianas. Dentro de este complejo mundo microbiano, se suelen producir asociaciones estables entre éstas e interacciones entre ellas que reflejan la capacidad metabólica de las diferentes especies microbianas involucradas (principalmente bacterias ácido lácticas o BAL y levaduras).

Es importante destacar que la composición de la microbiota presente en la MMC puede variar según la región geográfica y los ingredientes utilizados en la elaboración de la masa madre. Esto significa que cada pan elaborado con MMC es único y puede tener características organolépticas y nutricionales distintas.

En definitiva, la microbiota presente en la MMC es un elemento esencial para la elaboración del pan artesano y para sus propiedades organolépticas. Además, la presencia de bacterias y levaduras beneficiosas para la salud hacen del pan elaborado con MMC una opción nutritiva y saludable.

<b>MICROORGANISMOS PROCARIOTAS (BACTERIAS)</b>	<b>MICROORGANISMOS EUCARIOTAS (LEVADURAS)</b>
<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	<i>Kazachstania exigua</i>
<i>Fructilactobacillus plantarum</i>	<i>Kazachstania barnetti</i>
<i>Fructilactobacillus alimentarius</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Fructilactobacillus brevis</i>	<i>Candida humilis</i>
	<i>Candida milleri</i>

**Tabla 1.- Microbiota presente en la Masa Madre de Cultivo (MMC) utilizada en el presente estudio**

### 3.3. La fermentación en panadería

La fermentación en la elaboración del pan es un proceso biológico en el cual microorganismos, principalmente levaduras y bacterias, descomponen los azúcares de la harina y producen dióxido de carbono, lo que hace que la masa del pan se eleve y tenga una textura más suave.

Durante la fermentación, las levaduras consumen los azúcares de la harina y producen etanol y dióxido de carbono. El dióxido de carbono es lo que hace que la masa del pan se eleve determinando un aumento de volumen y esponjosidad, mientras que el etanol se evapora durante el proceso de horneado. Las bacterias, por otro lado, producen ácido láctico y ácido acético, lo que contribuye a las propiedades organolépticas del pan resultante descritas por nuestro panadero de referencia (sabor profundo, aroma ácido y consistencia de la corteza del pan).

Dependiendo del tipo de harina, cantidad de agua, tiempo, temperatura de fermentación y microorganismos presentes en la harina se producirán los siguientes tipos de fermentaciones:

- Fermentación alcohólica: Consiste en el consumo de los azúcares por parte de las levaduras y en la obtención del CO<sub>2</sub> y el etanol. Las levaduras utilizan los azúcares como la glucosa para producir H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> y ATP. Bajo condiciones anaeróbicas, las levaduras realizan la fermentación generando etanol y CO<sub>2</sub>.
- Fermentación homoláctica: Se realiza por las bacterias ácido lácticas (BAL) homofermentativas, que emplean azúcares de la harina para producir ácido

pirúvico y posteriormente ácido láctico. Se utiliza un mol de glucosa, que por vía glicolítica, se transforma en dos moles de ATP.

- Fermentación heteroláctica: Se lleva a cabo por las BAL heterofermentativas, que emplean glucosa ácido láctico, ácido acético, etanol y CO<sub>2</sub>, a través de la ruta del fosfogluconato, para obtener una molécula de ATP.

La fermentación en la elaboración del pan es un proceso complejo que involucra la interacción entre microorganismos, enzimas y sustratos. Por tanto, la selección y manejo de los microorganismos, así como la optimización de las condiciones de fermentación son factores clave en la obtención de panes de alta calidad (*Bernabé et al.* 2007).

En esta elaboración del pan, la fermentación es un tema ampliamente estudiado en la literatura científica. Algunos estudios han investigado los efectos de la composición de la harina y la temperatura en la actividad de las levaduras y bacterias durante la fermentación del pan (*Pauline et al.*, 2008; *Wu et al.* 2012). Otros estudios se han enfocado en la selección de cepas de levaduras y bacterias para la elaboración de panes con características específicas (*Luangsakul et al.*, 2009; *Li et al.*, 2016).

En conclusión, la fermentación es un proceso esencial en la elaboración del pan y tiene un impacto significativo en sus características organolépticas. La investigación en este campo sigue evolucionando, con el objetivo de mejorar la calidad y diversidad del pan.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### *4.1. Masa Madre de Cultivo (MMC)*

La Masa Madre de Cultivo (MMC) utilizada en el presente estudio procede de panaderos que imparten el Curso de Especialización en Panadería y Bollería Artesanal en el IES Gran Capitán y colaboran con nuestro IES Maimónides dentro de la Red Pericles-FP en Córdoba.

La masa madre es una mezcla de harina y agua que ha sido fermentada por bacterias y levaduras naturales, lo que da su característico sabor y aroma descrito por nuestro panadero de referencia. Para mantener viva la masa madre y asegurar su correcto funcionamiento en la elaboración del pan artesano, es necesario refrescarla regularmente y de esta manera, conseguir para mantener un equilibrio entre la microbiota existente en ella (*Corsetti*, 2013).

El refresco de la masa madre consiste en retirar una porción de la masa madre existente y añadirle harina y agua fresca. La cantidad de harina y agua que

se añadió dependió de la receta: MMC sólida con proporción 1:2 (doble de harina que de agua) y MMC líquida con proporción 1: 1 (igual cantidad de harina y agua). Después de mezclar bien los componentes se deja fermentar la masa durante varias horas, hasta que haya crecido y burbujeado (produciendo pequeñas cantidades de CO<sub>2</sub>, etanol y ácidos orgánicos por la acción de las BAL y las levaduras lo que le da el característico sabor y aroma descrito por nuestro panadero de referencia).

Según nuestro panadero, las MMC sólidas resultantes (1:2) son más ácidas y se usan para fabricar panes con volumen. Mientras que las MMC líquidas (1:1) son más lácticas y llevan más gluten degradado que facilita la extensión de la masa para fabricar panes tipo *baguette*.

#### 4.2. Materiales empleados

Los equipos de laboratorio utilizado ha sido ph-metro, balanza granataria, campana de flujo laminar, autoclave, vórtex, placa calefactora con agitador magnético, estufas de cultivo, microondas, microscopios, mecheros. Asimismo, se utilizaron ordenadores para la elaboración del material escrito y análisis de resultados. El alumnado usó el móvil para la captura de imágenes al microscopio y la realización del cuestionario online.

El material empleado es el propio de un laboratorio de microbiología educativo, tal como, asas de siembra, placas de *Petri*, asas de *Digrafsky*, tubos de ensayo, gradillas, matraces Erlenmeyer, algodón graso, bolsas de *Stomacher* estériles, recipientes estériles de toma de muestras, pinzas metálicas, pinzas de madera, pipetas *Pasteur*, micropipetas, puntas estériles, portaobjetos, cubreobjetos, alcohol etílico 96°C, agua destilada, etc.

Para realizar los recuentos de microorganismos se emplearon distintos medios de cultivo: SB (Agar Sabouraud), YEPD (Extracto de peptona 1%, Peptona 2%, Glucosa o Dextrosa 2%, Agar 2%, agua doble destilada), MRS (Man, Rogosa y Sharpe), Manitol [Manitol 2,5%, Extracto de Levadura 0,5%, Peptona 0,3%, Agar 2%, Cicloheximida (0,4g/L)], PCA (Plate Count Agar), agua de peptona como diluyente o solución salina estéril (9 g/L). Asimismo, para la observación microscópica de las colonias crecidas en medio de cultivo, se realizó una tinción simple de las muestras con azul de metileno al 1% y posterior visualización al microscopio (40X). Se realizaron captura de imágenes utilizando el móvil.

#### 4.3. Planificación de las sesiones

Se trabajó durante cinco sesiones:

- Sesión 1 (Enero): Presentación normas de laboratorio, objetivos del proyecto e introducción a la elaboración artesanal del pan. Aprender los fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos para recuento y aislamiento, así como sus aplicaciones. Profundizar en los métodos de siembra, homogeneización de las muestras, y preparación de diluciones seriadas para recuento y aislamiento de microorganismos en diferentes medios de cultivo. Conocer el material utilizado en el laboratorio de microbiología. Cuestionario autoevaluación consumo pan en adolescentes.
- Sesión 2: (Febrero): Recogida de muestras MMC y medida pH. Realización del primer recuento con un amplio rango de diluciones y distintos medios de cultivo. Se realizaron siembras de MMC líquida y sólida a 8°C. Observación microscópica de colonias crecidas. Análisis de los resultados. Realización imágenes, gráficas y tablas con los resultados obtenidos.
- Sesión 3 (Marzo): Recogida de muestras MMC y medida pH. Realización del segundo recuento, introduciendo la variable de la temperatura (2°C y 8°C), acotando las diluciones a cinco, e introduciendo nuevos medios de cultivo. Se varía el método de homogeneización de la MMC sólida, con un amasado suave con los dedos, en la “bolsa de Stomacher”. Observación microscópica de colonias crecidas. Análisis de los resultados. Realización imágenes, gráficas y tablas con los resultados obtenidos.
- Sesión 4 (Abril): Recogida de muestras MMC para su análisis y medida pH. Realización del tercer recuento, donde se realizan cuatro diluciones de un único medio para levaduras, y tres diluciones para bacterias con la técnica de siembra en masa con doble capa, para conseguir las condiciones de anaerobiosis. Observación microscópica de colonias crecidas. Análisis de los resultados. Realización imágenes, gráficas y tablas con los resultados obtenidos.
- Sesión 5 (Abril): Elaboración de un póster científico, memoria de investigación y presentación oral de los resultados.

#### 4.4. *Estudio previo sobre consumo pan en adolescentes del IES Maimónides*

Se elaboró un cuestionario online (<https://forms.gle/SnuzKVhoKjA6iF3t7>) a través de la plataforma Classroom con un total de 21 preguntas relacionadas con el consumo de pan. El cuestionario fue realizado por un total de 100 estudiantes del IES Maimónides elegidos al azar y con un rango de edad de 12 a 18 años.

Los resultados obtenidos fueron analizados por los estudiantes de 1º Bachillerato en la materia de Anatomía Aplicada.

#### 4.5. Recogida y conservación de muestras MMC

La recogida de muestras se realizó un día después de refrescar la MMC, siendo conservada en nevera portátil (2-4°C) e introducida en el frigorífico del laboratorio de microbiología a 2°C y/o a 8°C, según el momento del estudio. La muestra se presenta en recipiente estéril con cierre hermético.

#### 4.6. Análisis microbiológico de MMC sólidas y líquidas

Se pesaron 25 g de cada MMC (sólida y líquida) en 225 ml de agua de peptona estéril. En el caso de la MMC sólidas (1:1), se usaron 25 g de MMC sólida en 225 ml de agua de peptona estéril. Se procedió a su homogeneización en la bolsa de *Stomacher*, y posteriormente se realizaron las diluciones decimales seriadas ( $10^{-2}$  a  $10^{-8}$ ) utilizando tubos con solución salina estéril para el posterior recuento de microorganismos (UFC/ml).

A partir de las MMC líquidas (1:2) se realizaron diluciones seriadas de las muestras ( $10^{-2}$  a  $10^{-8}$ ), para posteriormente proceder al recuento de los microorganismos crecidos en el medio de cultivo (UFC/ml: Unidades Formadoras de Colonias por mililitro). En todos los casos (MMC sólida y líquida), se realizaron las siembras por triplicado como se indica a continuación:

En el primer recuento se procede a realizar las siete diluciones en tres medios de cultivo diferentes: YEPD (Agar Extracto Levadura Peptona Dextrosa), SB (Sabouraud) y MRS (Man, Rogosa, Sharpe). Véase Tabla 2.

PRIMER RECUESTO 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	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$

**Tabla 2.- Medios de cultivo y diluciones seriadas realizadas en el primer análisis microbiológico de las MMC sólidas y líquidas. Cada ensayo se realizó por triplicado.**

En el segundo recuento y atendiendo a los resultados obtenidos en el primer recuento, se acotan las diluciones y se diversifican los medios de cultivo más adecuados para bacterias ácido lácticas (BAL); MSA (Agar Manitol Salado con Cicloheximida) y PCA (Plate Count Agar). Véase Tabla 3.

SEGUNDO RECUESTO 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	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$

**Tabla 3.- Medios de cultivo y diluciones seriadas realizadas en el segundo análisis microbiológico de las MMC sólidas y líquidas. Cada ensayo se realizó por triplicado.**

En el tercer recuento, se centra en el medio que mejor resultado obtiene con levaduras (YEPD), y en una modificación de la técnica de siembra con medio MRS para bacterias, realizando una siembra de diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  en masa con doble capa para buscar condiciones de anaerobiosis. Véase Tabla 4.

En todos los casos se utilizó como control positivo la muestras madre de MMC, y como control negativo (medios de cultivo sin sembrar).



TERCER RECUENTO MICROORGANISMOS				
MEDIO DE CULTIVO	DILUCIONES SERIADAS			
YEPD	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
MRS (doble capa)	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	

**Tabla 4.- Medios de cultivo y diluciones seriadas realizadas en el tercer análisis microbiológico de las MMC sólidas y líquidas. Cada ensayo se realizó por triplicado.**

#### 4.7. Medida pH en muestras MMC

Conocer el valor del pH y el contenido de ácido de una MMC es un parámetro de control importante. Cuanto menor sea el valor del pH en la MMC, menor es la degradación del almidón y más estable es la masa del pan cocido. Cuando se determina el grado de acidez de una MMC, se identifica la cantidad de ácido contenido en ésta. Conocer esto permite comprobar posibles errores de acidez o evaluar el pan para obtener la acidez correcta para evitar una reducción en la calidad. Para comprobar el valor de pH, se saca la muestra de la nevera de microbiología a 2°C y/o a 8°C, según muestra. Se debe atemperar la muestra para que no haya fluctuaciones en la medida. Tras ese tiempo de espera se introduce la punta de medición del pH-metro en la masa madre 2 cm aproximadamente.

En la pantalla del instrumento se indica la medida de cada una de las muestras estudiadas y la temperatura de la MMC. El pH-metro se ha de calibrar siempre antes de realizar la medida, con tampones de pH 4 y pH 7. Antes de cada una de las medidas se lleva a cabo un proceso de limpieza de la punta del pH-metro, introduciéndose en agua destilada y a continuación en alcohol etílico.

#### 4.8. Análisis microscópico de la microbiota MMC

Para el análisis microscópico se seleccionaron aquellas colonias crecidas en medio sólido (SB o YEDP) que presentaron forma redonda, de aspecto cremoso y color blanquecino coincidiendo con las especificaciones morfológicas descritas en la guía de referencia para levaduras (Madigan 2009).

Se realizaron tinciones simples con azul de metileno al 1% de las colonias aisladas que crecieron en el medio de cultivo para su observación al microscopio.

## 5. RESULTADOS

### 5.1.- Consumo pan en adolescentes del IES Maimónides

El 55% de los encuestados fueron del sexo masculinos y el 45% femenino. El 84% eran miembros de familias numerosas (3-5 familiares), y solo el 8% de los encuestados tenía algún miembro de la familia alérgico o intolerante a algún componente del pan.

El 77% de los encuestados consumía pan diariamente (durante la merienda principalmente) y prefería el pan artesano, pero solo el 52% lo compraba en panaderías especializadas y la mitad (50%) incluía el pan en su desayuno. Aunque solo el 64% de los encuestados conoce lo que es la masa madre, el aspecto más importante considerado en el pan fue el sabor (42%), seguido de la textura (29%) y la apariencia (13%). Por encima del olor, precio y cercanía de la panadería al domicilio del encuestado/a.

Asimismo, el 75% de los encuestados consume pan con gluten frente al 25% que consume pan sin gluten. Solo el 64% conoce lo que es la masa madre.

### 5.2.- Recuento colonias en MMC analizadas

Tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, solamente se observó el crecimiento de levaduras (microorganismos eucariotas) en las MMC (sólida y líquida) conservadas tanto a 2°C como a 8°C. Véase Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) en el Gráfico 1.

- 1) Resultados primer recuento realizado: las levaduras crecieron solamente en la MMC líquida ( $6,7 \cdot 10^6$  UFC/ml a 8°C).
- 2) Resultados segundo recuento: se observó mayor crecimiento de levaduras en MMC sólidas y líquidas conservadas a 8°C que a 2°C. De esta manera, a 8°C se contabilizaron  $3,2 \cdot 10^6$  UFC/ml en MMC sólida frente a  $7 \cdot 10^6$  UFC/ml en la MMC líquida. Mientras que a 2°C en la MMC sólida se observaron  $2,2 \cdot 10^6$  UFC/ml frente a  $3 \cdot 10^6$  UFC/ml en MMC líquida.
- 3) Resultados tercer recuento: en las MMC sólidas el crecimiento fue mayor a 8°C que a 2°C ( $7,4 \cdot 10^6$  UFC/ml frente a  $5,2 \cdot 10^6$  UFC/ml). Sin embargo, en las MMC líquidas se observó un mayor crecimiento de levaduras a 2°C (212.

$10^6$  UFC/ml) que a  $8^{\circ}\text{C}$  ( $24 \cdot 10^6$  UFC/ml), coincidiendo con la ruptura de la cadena de frío el día previo a la recogida de estas muestras.



**Gráfico 1- Crecimiento microbiano (levaduras) observado en las Masas Madre de Cultivo (MMC sólidas y líquidas) conservadas a  $2^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$  de temperatura. UFC/ml: Unidades Formadoras de Colonias por mililitro**

### 5.3.- Valores pH obtenidos en MMC analizadas

La medida del pH de referencia la realizó el panadero al refrescar las muestras de Masa Madre de Cultivo (MMC) sólidas y líquidas que íbamos a analizar en nuestro proyecto de investigación. Estos valores de referencia se tomaron el 24 de enero de 2023, y fueron de 4.10 en la MMC sólida y 3.94 en la MMC líquida, y el 11 de abril siendo 3.94 en la MMC sólida y 3.78 en la MMC líquida.

En la tabla 5 se muestran los valores de pH obtenidos en las diferentes MMC analizadas microbiológicamente en nuestro laboratorio desde el día siguiente a la primera medida tomada por el panadero.

En general, no se observaron diferencias significativas entre el pH medido en las muestras MMC sólida (3.77 y 3.94) y MMC líquida (3.94 y 4) analizadas a  $2^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Todas las muestras presentaron un  $\text{pH} \leq 4$  (ácido), delatando la presencia de ácidos y por tanto de microorganismos procariotas (bacterias) en las MMC analizadas.

FECHA	VALOR pH MEDIDO EN MASAS MADRE CULTIVO			
	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

**Tabla 5- Medidas pH en muestras MMC sólidas y líquidas analizadas en nuestro laboratorio**

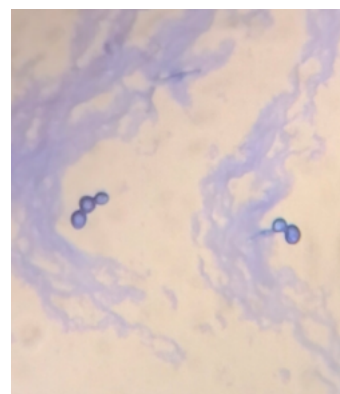
#### 5.4. Visualización microbiota presente en MMC

Tras realizarse la tinción simple con azul de metileno al 1%, se ha comprobado que son levaduras por su aspecto redondeado, tamaño, y porque algunas de ellas se han encontrado en gemación.

a)



b)



**Imagen 1- Visualización macroscópica (a) y microscópica de levaduras (b). A la izquierda colonias de levaduras crecidas en medio YEDP. A la derecha, levaduras en gemación (objetivo 40X; cámara Realme9 f/1,75)**

## 6. CONCLUSIONES

- 1) Podemos concluir que la población de adolescentes del IES Maimónides evaluados, aprecia las propiedades organolépticas del pan artesano, a pesar de desconocer las propiedades nutricionales de este pan. Incluir el pan artesano en el desayuno puede ser una excelente manera de comenzar el día con una comida saludable y satisfactoria para estos adolescentes.
- 2) La acidez de la MMC evaluadas oscilaron entre 3.68 a 4.30 encontrándose dentro del rango descrito por *Rupesh & Shraddha* (2011) para las masas madres elaboradas con harina de trigo y cuya fermentación condiciona la actividad de las levaduras, la acción amiolítica y la actividad de la flora contaminante.
- 3) Aunque no se observó crecimiento bacteriano (microorganismos procariotas) en las MMC sólida y líquida, la acidez observada en estas MMC y las características organolépticas del pan resultante, delataría la poca presencia de bacterias BAL en estas masas ácidas, coincidiendo los resultados obtenidos por *Gobetti et al.* (2013) para *Lactobacillus sanfranciscensis* a pH menor de 4.
- 4) Se observó mayor crecimiento de levaduras en la MMC líquida que en la MMC sólida.
- 5) El factor temperatura influye en el crecimiento de las levaduras, ya que se observó un mayor crecimiento a 8°C que a 2°C.
- 6) Es importante controlar la cadena de frío en la conservación de las MMC sólidas y líquidas preferiblemente a 2°C, para no alterar las propiedades organolépticas de los productos panaderos resultantes. Además, se ha observado que la MMC líquida se ve más afectada que la MMC sólida por el cambio de temperatura.
- 7) Atendiendo a los resultados obtenidos, podemos concluir que al comienzo de la fermentación el pH se mantiene constante. En la fase intermedia, la acidez observada aumenta debido a la acción de las levaduras y durante la etapa final, las levaduras desaparecen y la acidez titulable y el pH dependen de las BAL del sistema. Las levaduras presentes en la masa madre no se ven prácticamente afectadas por la presencia de ácido láctico, sin embargo, si por el ácido acético en el producto final.
- 8) El presente trabajo de investigación supone el punto de partida en la investigación de las MMC analizadas y su relación con las propiedades organolépticas observadas por nuestro panadero de referencia en el pan artesano resultante.

## 7. AGRADECIMIENTOS

Damos las gracias a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de este trabajo. En especial a Nicolás Huertas Fuentes, profesor del Ciclo de especialización de Panadería y Bollería Artesanal, por iniciar el proyecto y proporcionarnos las muestras de MMC, a los alumnos de 1º y 2º de Grado Medio de Operaciones de Laboratorio del IES Maimónides de Córdoba, así

como al equipo educativo por flexibilizar las horas de clase para permitir hacer las siembras y cultivos de este proyecto. Asimismo, agradecer al CEP y a la Red Pericles por la interacción entre centros para que este proyecto se lleve a cabo.

## 8. 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/>