



ESTANDARIZACIÓN DE LA FABRICACIÓN INDUSTRIAL DE MASA MADRE VIVA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2019/20

Alumna:

Virginia Izquierdo Velasco

Tutores:

Carlos Antonio Blanco Fuentes (*Universidad de Valladolid*)

José María Giralda Sánchez (*Lesaffre Ibérica S.A.*)

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)

Universidad de Valladolid

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
2.1.	Masas madres	3
2.1.1.	Bacterias ácido-lácticas	4
2.1.2.	Levaduras.....	6
3.	OBJETIVOS	9
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1.	Materiales y equipos:	10
4.1.1.	Instalación	10
4.1.2.	Materias primas para el proceso productivo.....	11
4.1.3.	Reactivos químicos.....	11
4.1.4.	Equipos de laboratorio.....	11
4.1.5.	Medios de cultivo	12
4.1.6.	<i>Software</i>	12
4.2.	Métodos:.....	12
4.2.1.	Análisis fisicoquímicos	12
4.2.2.	Análisis microbiológicos.....	13
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
5.1.	Limpieza de la instalación	14
5.1.1.	Limpieza completa	15
5.1.2.	Limpieza de fin de ciclo.....	16
5.2.	Proceso productivo masa madre de trigo duro.....	17
5.2.1.	Preparación de la instalación	17
5.2.2.	Acondicionamiento del fermentador.....	17
5.2.3.	Adición de los ingredientes	18
5.2.4.	Proceso fermentativo	19
5.2.5.	Características aromáticas	19
5.2.6.	Acondicionamiento del producto	20
5.2.7.	Control del proceso productivo	20
5.3.	Acondicionamiento del producto	27
5.4.	Mantenimiento de la calidad de las masas madre.....	27
6.	CONCLUSIONES	28
7.	REFERENCIAS	29
ANEXO 1. Condiciones de limpieza de la instalación de producción de masas madre		30
ANEXO 2. Gráficos de Shewart para el control del proceso productivo de masas madre		33
AGRADECIMIENTOS		37

1. RESUMEN

Las nuevas tendencias en panificación exigen productos cada vez más saludables, manteniendo la calidad organoléptica artesana. En este punto, cobran importancia las masas madres, cuya producción industrial garantizará la homogeneidad y reproducibilidad del producto. Este trabajo comprende la estandarización del proceso de producción industrial de masa madre de trigo duro elaborada a partir de levaduras y bacterias ácido-lácticas homo y heterofermentativas, dentro de la cual se incluyen el mantenimiento de las instalaciones y el acondicionamiento del producto. El seguimiento físico-químico y microbiológico de forma continua nos permite la detección del punto final del proceso fermentativo en el momento en que estos parámetros se estabilizan a lo largo del tiempo. De esta forma, queda garantizada la calidad y la seguridad del producto en cuestión.

ABSTRACT

New trends on bakery are demanding increasingly healthy products maintaining the traditional organoleptic product quality. At this point, the sourdoughs, whose industrial production will guarantee the homogeneity and reproducibility of this product, gain importance. In this project covers the standarization of the industrial production of durum wheat sourdough prepared from yeasts and acid-lactic homo and heterofermentative bacterias, within which included the maintenance of production plant and product conditioning. Continuous physico-chemical and microbiological monitoring allows us to find the end point of the fermenting process once that parameters have been stabilized over time. In that way, the product quality and security are been ensured.

2. INTRODUCCIÓN

Los alimentos a base de cereales son unos de los más interesantes por su contenido en ácidos fenólicos y carotenoides y por sus efectos antioxidantes (Antognoni, F. *et al.*, 2019). No obstante, para conseguir la forma en la que normalmente los consumimos, los cereales sufren un proceso de transformación, siendo la elaboración de pan a partir de granos de trigo blando (*Triticum aestivum L.*), una de las más imprescindibles de nuestro día a día. Aunque la técnica haya variado a lo largo de la historia, la importancia de este producto ha sido reconocida globalmente, llegándose a considerar un alimento esencial en la dieta (Dewettinck, K. *et al.*, 2008).

Los ingredientes necesarios para la elaboración del pan son harina de cereales, agua, levadura y sal. A esta mezcla pueden añadirse otros ingredientes funcionales que ayuden a mejorar el proceso de producción o incrementen el valor nutricional (Dewettinck, K. *et al.*, 2008), así como algún aditivo o coadyuvante tecnológico que mejore las características sensoriales del producto (Gil, Á.; Serra, L. 2010). Lo más común es utilizar mezclas de aditivos con diferentes funciones tecnológicas, englobadas dentro de un producto conocido como “mejorante” que contiene principalmente enzimas, emulgentes, (estabilizadores de la masa, como CSL (E-482), SSL (E-481), DATEM (E-472), o lecitinas (E-322)) y oxidantes (ácido ascórbico (E-300)). También es frecuente el uso de propionato cálcico (E-282) como conservante (BOE, RD 308/2019).

Conseguir unas características organolépticas óptimas depende de factores como la naturaleza de las materias primas, los tiempos de amasado y reposo, y las condiciones ambientales; así como un pan de elevada calidad será aquel que presente un bajo índice glicémico, con una importante fuente de proteínas, fibra, vitaminas, minerales como el magnesio, y antioxidantes (Dewettinck, K. *et al.*, 2008); el problema es que algunos tratamientos tecnológicos pueden afectar a la composición original de los granos, llegando a modificar el contenido fitoquímico (Antognoni, F. *et al.*, 2019).

Una alternativa nutricional puede ser el pan elaborado a partir de harina de trigo integral que, con respecto al pan blanco, presenta niveles superiores de dichos componentes y, por tanto, su consumo reduce el riesgo de padecer enfermedades crónicas como la diabetes, el cáncer o la obesidad, así como enfermedades cardiovasculares (Tebben, L.; Shen, Y.; Li, Y. 2018).

Sin embargo, la producción de panes integrales requiere de un mayor número de transformaciones frente al pan tradicional, por lo que el uso de aditivos se ha convertido en una práctica común en la industria de panificación (Tebben, L.; Shen, Y.; Li, Y. 2018).

En contraposición, la demanda de alimentos con menos calorías, mayor contenido en fibra, menos sal, y un reducido número de aditivos, resulta cada vez más frecuente (Dewettinck, K. *et al.*, 2008), por lo que hoy en día el interés por el uso de masas madre se encuentra en continuo crecimiento.

2.1. Masas madres

La elaboración de las masas madre es una práctica que se remonta a la antigüedad, y consiste en un cultivo simbiótico de levaduras y bacterias ácido-lácticas (BAL) en un medio a base de cereal (Antoja, F. J. 2015). Estas, se adicionan a una masa panaria elaborada previamente y se someten a una operación de fermentación durante varias horas obteniendo valores de pH inferiores a 4.2 (BOE, RD 308/2019), por acción de las BAL.

Las masas madre, modifican las propiedades de desarrollo de la masa (Gil, Á.; Serra, L. 2010), y proporcionan ciertas características al pan como volumen, textura y sabor. En cuanto al aspecto nutricional, mejora la digestibilidad, incrementa el contenido fenólico total, la actividad antioxidante y la biodisponibilidad de los nutrientes (Winters, M. *et al.*, 2019). Además, previenen el deterioro microbiano, reduciendo así la necesidad de uso de conservadores químicos y otros aditivos (Martorana, A. *et al.*, 2018).

La mejora organoléptica depende de la naturaleza de la microbiota, mezcla de levaduras y BAL, en proporción 1:100 (Vogel, R.; Knorr, R.; Muller, M. 1999), sin embargo, es difícil garantizar la homogeneidad ya que se ve influenciada por varios factores entre los que se incluyen las materias primas utilizadas o las condiciones de incubación durante el proceso de fermentación (Martorana, A. *et al.*, 2018), que desencadenarán el crecimiento selectivo de los diferentes microorganismos presentes en la masa final (Gil, Á.; Serra, L. 2010), por lo que el desarrollo industrial de estos cultivos es esencial para garantizar las condiciones de reproducibilidad y permitir al panadero ahorrar en tiempo y mano de obra.

La producción industrial de las masas madre comienza con el inicio de la actividad enzimática de las enzimas endógenas de la harina de cereal sobre el almidón, degradándolo y dando lugar a los azúcares fermentables (maltosa, glucosa y fructosa), que sirven de alimento a las bacterias ácido-lácticas.

Paralelamente, se inicia la actividad proteolítica de las enzimas producidas durante la fermentación láctica que, junto con la acidez inducida por las bacterias, provocan la solubilización del gluten y proporcionan el pH óptimo de actuación de las proteasas de los cereales (Garrido, M. 2020).

Las masas madre comerciales pueden clasificarse en los siguientes grupos (Gil, Á.; Serra, L. 2010):

- *Starters* (cultivos iniciadores): mezcla de microorganismos vivos (levaduras seleccionadas y bacterias homo y/o heterofermentativas) listos para adicionar a la harina. Al tratarse de cepas puras, garantizan la regularidad y estabilidad.
- Masas madre vivas: masas madre biológicamente activas en forma líquida, lo que facilita su integración con el resto de los componentes.
- Masas madre desvitalizadas: la actividad de sus microorganismos se encuentra “pausada” y por tanto, no tienen capacidad fermentativa, pero sí son capaces de proporcionar acidez y aromas a la masa. La ventaja es que tienen una mayor vida útil. Se comercializan tanto en forma líquida como en sólida.

2.1.1. Bacterias ácido-lácticas.

Quizás lo más característico de las masas madre sean las bacterias ácido-lácticas, un conjunto de bacterias anaerobias facultativas de pared Gram-positiva (Parra, R. A. 2010).

Las BAL pertenecen a la familia taxonómica *phylum Firmicutes*, que comprende alrededor de 20 géneros, entre los que destaca *Lactobacillus*, por su gran tamaño (Parra, R. A. 2010). Dentro de este género, de las masas madre se han extraído mayoritariamente especies como *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. crispatus*, *L. sanfrancensis*, *L. ponds*, aunque también se han detectado otros géneros como *Leucnostoc* sp. y *Streptococcus* sp. (Gil, Á.; Serra, L. 2010).

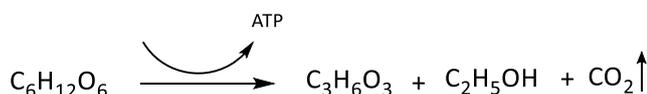
El crecimiento de las BAL requiere de nutrientes, aminoácidos, vitaminas del grupo B, y carbohidratos fermentables para producir lactato y en ciertas ocasiones, otros subproductos como acetato, etanol, CO₂, formiato o succinato (Parra, R. A. 2010), por lo que podemos diferenciar entre:

- Bacterias homofermentativas: siguen la ruta *Embden-Meyerhoff-Parnas*, mediante la cual convierten una molécula de glucosa en dos de ácido láctico.



Ecuación 1. Fermentación homoláctica

- Bacterias heterofermentativas: producen cantidades equimoleculares de ácido láctico, CO₂, ácido acético y/o etanol.



Ecuación 2. Fermentación heteroláctica

La mezcla de ácidos láctico y acético confiere a la masa determinadas características sensoriales a destacar frente a las obtenidas por las BAL homofermentativas. Además, generan CO₂ que incrementará posteriormente, el volumen del pan, o incluso pueda llegar a transformarse en ácido acético gracias a la presencia de las acetobacterias (Antoja, F. J. 2015).

El control del contenido en ácido acético y láctico es importante, pero más lo es su relación, conocida como “cociente de fermentación”. Un contenido en ácido acético bajo da un alto cociente de fermentación y un sabor suave, mientras que un bajo cociente de fermentación proporciona un sabor fuerte y ácido.

En las masas de trigo de larga fermentación, el contenido en ácido-láctico es de entre 600 y 800 mg /100 g de masa madre, mientras que el del ácido acético se encuentra en torno a 80-100 mg /100 g (Antoja, F. J. 2015).

Algo realmente interesante de algunas BAL es que pueden considerarse organismos probióticos (Da Min, P. 2019), capaces de incrementar los niveles de compuestos bioactivos (antioxidantes, anticancerígenos, o péptidos antiinflamatorios, ácido γ -butírico), y fitoquímicos minimizando así el crecimiento patógeno, aliviando los efectos provocados por la intolerancia a la lactosa y las consecuencias de la diarrea, preservando las mucosas y reduciendo el nivel de colesterol (Da Min, P. 2019), así como incrementando la bio-accesibilidad de los nutrientes y carotenoides, detectándose altas concentraciones de luteína y zeaxantina en masas enriquecidas con *L. plantarum*, a diferencia de lo que ocurre en masas enriquecidas con otras BAL (Antognoni, F. *et al.*, 2019).

Algunas de estas propiedades, sin embargo, podrían verse minimizadas a lo largo del proceso de panificación. En concreto, su actividad inmunomoduladora, se mantiene incluso con la inactivación de la actividad microbiana (Da Min, P. 2019).

Por otra parte, ciertos *Lactobacillus*, son capaces de producir aminas biógenas (Da Min, P. 2019), como histamina, triamina y cadaverina. No obstante, diversos estudios descartan esta posibilidad en BAL utilizadas en panificación, como es *L. plantarum*, ya que carece de los genes precursores de estos componentes (Da Min, P. 2019), por lo que son considerados como GRAS, (*Generally Recognized As Safe*) (Figuerola-González, I. 2011).

En cuanto a las características funcionales, estas bacterias proporcionan una rápida fermentación e influyen sobre el metabolismo de las levaduras, provocando la acidificación de las masas tras las primeras horas de fermentación debido a la producción de ácidos orgánicos, que actúan favorablemente sobre la estructura del pan,

demostrando tener un positivo efecto sobre el gluten y el almidón, además de inhibir la capacidad de actuación de las amilasas endógenas y retardar el envejecimiento del pan durante el período de almacenamiento, protegiéndolo frente al deterioro causado por bacterias y hongos. También consiguen aumentar la capacidad de retención de gas y agua en el interior de las masas (Martorana, A. *et al.*, 2018).

La mayoría de las cepas de BAL estudiadas, muestran una tolerancia de, al menos, un 1.31% de NaCl en la fórmula del pan, cantidad máxima legalmente permitida, (BOE, RD 308/2019). El NaCl, además del efecto potenciador del sabor que provoca sobre el pan, actúa sobre el gluten y sobre la actividad de las amilasas favoreciendo la producción de maltosa e influyendo en la capacidad fermentativa de los microorganismos. La falta de sal provocaría una rápida producción de CO₂ ocasionando un deterioro de la estructura del producto (Martorana, A. *et al.*, 2018).

Ciertas bacterias ácido-lácticas, además, son capaces de producir otros metabolitos como son los exopolisacáridos (EPS), con actividad metabólica sobre proteínas, azúcares y lípidos, lo que se traduce en funciones tecnológicas sobre la textura, la reología, el sabor, o la percepción sensorial del producto. Presentan propiedades gelificantes, emulsionantes, o estabilizantes (Parra, R. A. 2010) pudiendo sustituir a ciertos aditivos añadidos, lo que convertiría al pan en un producto de “etiqueta limpia” (Martorana, A. *et al.*, 2018).

Otros factores como mayores tiempos de amasado y reposo de las bacterias ácido-lácticas, así como factores ambientales (temperatura y pH de actuación), influyen favorablemente en la liberación de aromas (Garrido, M. 2020). Sabores más agrios caracterizan los panes que incluyen bacterias *L. plantarum* en su formulación (Winters, M. *et al.*, 2019).

Un aspecto más a valorar es el efecto sinérgico de la coexistencia de varias cepas de levaduras y bacterias, ya que resulta el mejor efecto en cuanto al volumen del pan se refiere (León, P. *et al.*, 2006). Un *starter* típico contiene entre 10⁷ y 10¹¹ UFC /g de bacterias lácticas y 10⁵-4·10⁶ UFC /g de levaduras, lo cual deja pocas posibilidades al crecimiento de flora contaminante en la masa madre (Antoja, F. J. 2015).

2.1.2. Levaduras.

Las levaduras son otros de los microorganismos característicos de las masas madre. De ellas, se han aislado géneros como *S. cerevisiae*, *S. exiguus*, *Torulopsis holmii*, *Candida krusei*, *Pichia norvegensis* y *Hansenula anomala* (León, P. *et al.*, 2006), siendo *Saccharomyces cerevisiae* la especie predominante en estos ecosistemas (Yang, H. *et*

al., 2020). Comprenden una amplia diversidad de cepas que afectan de manera diferente al desarrollo de la masa (Martorana, A. *et al.*, 2018), por lo que es importante su correcta selección en base a las características que se deseen conseguir.

No obstante, al tratarse de microorganismos que se encuentran presentes en el ambiente, a veces, no resulta necesario la adición forzada de levadura a las masas madre (Antoja, F. J. 2015). Por otra parte, la mezcla de varios géneros de levadura provoca un mayor efecto en el volumen del pan que aquellas que emplean combinaciones de los géneros *L. plantarum* y *L. brevis* (1:1), sin levadura (León, P. *et al.*, 2006).

Este tipo de levaduras, denominadas “levaduras salvajes”, no tienen la misma funcionalidad en las masas panarias que las levaduras homónimas cultivadas industrialmente (Antoja, F. J. 2015). Toleran el medio ácido (pueden crecer en presencia de ácido acético) (Martorana, A. *et al.*, 2018), son menos productoras de gas y algunas son capaces de fermentar la maltosa (Antoja, F. J. 2015).

Aunque la principal contribución de la levadura es su capacidad leudante, produciendo CO₂, etanol, glicerol y ácido pirúvico en etapas tempranas de la fermentación (Yang, H. *et al.*, 2020), esta puede verse afectada por la presencia de los ácidos orgánicos no disociados. El ácido acético inhibe la actividad de las levaduras en mayor grado que el ácido láctico, contrariamente, el alcohol producido por las levaduras reduce la producción de las bacterias lácticas (Antoja, F. J. 2015). Además, existe una competencia por los nutrientes presentes en la masa, sin embargo, la asociación BAL-levaduras puede resultar simbiótica en ciertas ocasiones. Las cepas de levadura dominantes en las masas madre son incapaces de fermentar la maltosa a bajos niveles de pH y crecen a costa de la glucosa que puedan fabricar las BAL heterofermentativas en tales condiciones, como resultado de la actuación de sus enzimas sobre ciertos disacáridos, como la sacarosa (Antoja, F. J. 2015).

En cualquier caso, el factor más limitante de la actividad enzimática y como consecuencia, de la capacidad fermentativa, es la harina, que varía en función de su grado de extracción. Esto también se relaciona con la acidificación de la masa y el contenido de compuestos volátiles. Un mayor contenido en cenizas aumenta la actividad metabólica y con ello la producción de ácidos, aminoácidos y compuestos volátiles (Antoja, F. J. 2015).

También, las levaduras juegan un papel importante en la producción de aromas. Entre 20 °C y 25 °C (Antoja, F. J. 2015) son capaces de producir un amplio rango de compuestos volátiles como alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres (Yang, H. *et al.*, 2020). En concreto, los panes elaborados con levaduras del género *S. cerevisiae* se caracterizan por proporcionar sabores afrutados y ser los preferidos entre los consumidores (Yang, H. *et al.*, 2020).

3. OBJETIVOS

Desde hace poco más de un año, la fábrica de levadura vallisoletana ha apostado por la producción industrial de masas madre destinando dentro de sus instalaciones, una planta a tal objetivo.

La amplia diversidad que comprende la naturaleza de las masas madre, en cuanto a su composición química y biológica, hace que un saber hacer en fermentación se plasme en el desarrollo del producto y resulte necesaria la estandarización y optimización del procedimiento productivo.

Objetivos del proyecto:

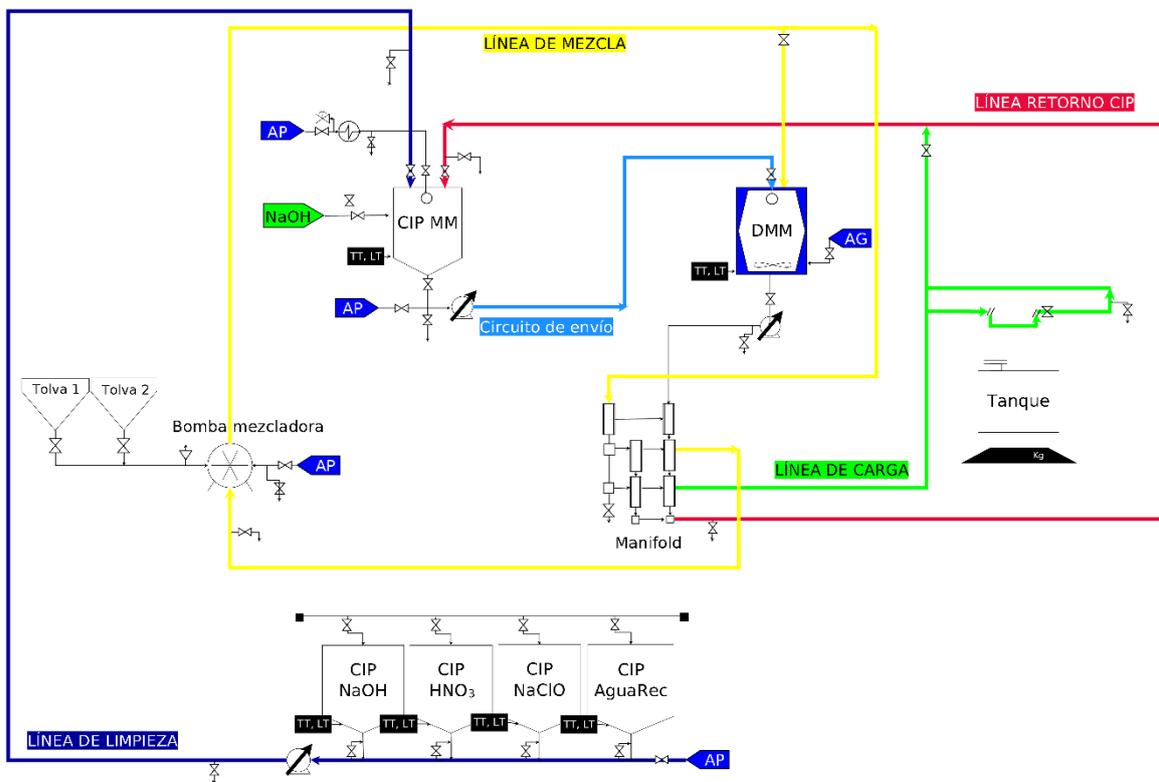
- Estandarizar el proceso de limpieza de la instalación dedicada a la producción de masas madre.
- Estandarizar el proceso de producción industrial de masa madre de trigo duro.
- Diseñar gráficos que permitan el control fisicoquímico de los próximos ciclos fermentativos de masa madre de trigo duro y de forma indirecta, ayuden a mantener el control microbiano.
- Verificar el punto final del proceso fermentativo.
- Comparar la capacidad fermentativa de *starters* de la especie *L. plantarum*, (adquiridos a diferentes proveedores (A y B)), a lo largo de un ciclo de producción.
- Establecer las diferencias existentes entre ciclos productivos de masas madre de igual formulación pero distinto grado de humedad.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales y equipos:

4.1.1. Instalación

La instalación destinada a la producción de masas madre en *Lesaffre Ibérica S.A.*, comprende un circuito cerrado que consta de tres líneas: “Línea de mezcla”, “Línea retorno CIP” y “Línea de carga”, conectadas entre sí por medio del *manifold*. La salida por la línea de mezcla comunica con la bomba mezcladora, que da entrada a los ingredientes añadidos en formato polvo por las tolvas, finalizando el ciclo en el fermentador (DMM). Además, el sistema de tuberías se encuentra vinculado a un depósito de limpieza (CIP MM), a través de una cuarta línea, “Línea de limpieza”.



Legenda:

	Llave de paso Agua de Proceso		Intercambiador de calor		Báscula
	Llave de paso Agua de Glicolada		Bomba con regulador de flujo		DMM, Depósito de Masas Madre
	Llave de paso NaOH		Bola de limpieza		CIP MM CIP Masas Madre
	Válvula simple		Bola de limpieza		Agitador
	Válvula reguladora		Válvula de tres vías		Manguera de doble posición
	Válvula de dos vías		Sistema de aireación		Transmisor de temperatura y volumen

Figura 1. Diagrama de flujo de la instalación destinada a la producción de masas madre.

Componentes principales de la instalación:

- Depósito Masa Madre (DMM), fermentador con encamisado de refrigeración provisto de un agitador.
- Depósito CIP Masa Madre (CIP MM), con regulador de temperatura.
- Bomba mezcladora, con manómetro y sensor de temperatura incorporados.
- *Manifold*, sistema de válvulas de tres vías que controlan el paso de solución por una u otra línea en base a las necesidades requeridas.
- Tolvas de diferentes diámetros de dosificación.
- Báscula, *Bizerba MCE*.

4.1.2. Materias primas para el proceso productivo

- Agua clorada (1.0-1.5 ppm).
- Harina de trigo duro.
- Harina de trigo malteada diastásica.
- Extracto de levadura en polvo.
- *Starters* liofilizados homo y heterofermentativos: *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*.
- Levadura seca, *Saccharomyces cerevisiae*, cepa panadera.

4.1.3. Reactivos químicos

- Hidróxido sódico, 0.1M.
- Kit *Checker*, (*Hanna instruments*) con DPD y KI, para la determinación del cloro total en agua de proceso.
- Acetato de sodio.
- Cloruro potásico.
- Aditivo espesante: goma xantana.

4.1.4. Equipos de laboratorio

- Agitador magnético y barras agitadoras.
- Balanza analítica de precisión, *Gram FS*.
- pHmetro *Crison*, modelo Basic 20.
- Viscosímetro rotatorio, *Brookfield DVII+*
- Titulador de acidez, *Tritoline 5000*.
- Cromatógrafo de líquidos, *ACQUITY UPLC H-Class*, equipado con una columna *AQUITY BEH Amide*, y un detector de índice de refracción, *ACQUITY Refractive*.

4.1.5. Medios de cultivo

- Rojo Billis (RB), análisis de Coliformes Totales.
- Agar Rapid *E. coli* (REC), análisis de Coliformes Fecales y *E. coli*.
- Man Rogosa y Sharpe, (MRS), análisis de bacterias lácticas.
- Agar Cloranfenicol (Agar YGC) con Nistatina, detección de levaduras y mohos.
- Caldos de cultivo para la detección de *Salmonella*, (selenito, tetracionato, ASAP, XLD).

4.1.6. Software

- Paquete Office 365.
- Statgraphics Centurion XVII.
- Dia Diagram Editor.

4.2. Métodos:

4.2.1. Análisis fisicoquímicos

- Medida de la concentración de cloro en el agua de proceso.

La concentración de cloro en disolución es determinada por análisis espectrofotométrico. La adición de N, N-dietil-fenil-diamina, (DPD) a una muestra de agua clorada dará lugar a una tonalidad rojiza, por reacción de esta con el cloro activo presente en la misma, siempre que el pH oscile entre 6.2 y 6.5. Para evitar interferencias analíticas, se añade sobre la misma muestra yoduro potásico (KI), con lo que se consigue eliminar el cloro combinado. Este análisis se realiza con un kit preparado y un lector espectrofotométrico portátil.

- Medida de acidez

El nivel de acidez puede medirse rápidamente con un pHmetro de precisión decimal.

- Análisis de ATT (Acidez Total Titulable)

Este análisis cuantifica el nivel de ácidos totales presentes en disolución, expresado como los mL de NaOH 0.1 M necesarios para llevar a pH 8.5, diez gramos de masa madre, (BOE, RD 308/2019), aunque el *Grupo Lesaffre* mantiene el estándar en un pH de 6.6. que será el tomado como referencia en los resultados de este trabajo.

La concentración de ácidos orgánicos se determina potenciométricamente gracias a un electrodo de vidrio y viene dada por la relación E-V (Potencial-Volumen), alcanzándose el punto final de la valoración al pH establecido. El titulador nos indicará de forma automática el volumen de NaOH consumido una vez alcanzado el estándar de pH.

4.2.2. Análisis microbiológicos

Los microorganismos indeseados aparecen, bien por una contaminación accidental originada por malas condiciones higiénicas, o bien por un desarrollo incorrecto de los parámetros del proceso. La acidez insuficiente puede llegar a producir coliformes, mientras que, si la contaminación tiene origen ambiental, sobre la capa superficial de la masa madre pueden desarrollarse mohos, capaces de esporular, (Antoja, F. J. 2015).

Recuento de microorganismos en masas madre:

- Cuantificación de coliformes totales (CT).

La incubación de los microorganismos tiene lugar durante 24 horas, a 30 °C y en un medio de RB.

- Cuantificación de coliformes fecales (CFX) y *E. coli* (EC).

Ambos tipos de coliformes se incuban durante 24 horas a 44 °C y en un medio REC, medio cromogénico selectivo que detecta de forma simultánea dos enzimas, β -D-glucuronidasa y β -D-galactosidasa, cuyos subtipos se combinarán dando lugar a la aparición de colonias características de los CFX o bien, propias de los EC.

- Cuantificación de bacterias lácticas.

El medio de cultivo MRS, proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, (*Lactobacillus*, entre otros). La incubación de tales bacterias se lleva a cabo durante 72 horas a 30 °C.

- Cuantificación de levaduras y mohos.

Las levaduras y los mohos pertenecen al mismo reino dentro de la clasificación taxonómica. Es por esto por lo que son capaces de crecer en el mismo medio de cultivo, como lo es el Agar YGC.

La incubación de levaduras tiene lugar durante 72 horas a 30 °C, mientras que la incubación de mohos se prolonga hasta los 5 días a 26 °C en combinación con el antibiótico Nistatina, capaz de inhibir el crecimiento de levaduras.

- Detección de *Salmonella*.

La contaminación del producto por *Salmonella* no es algo esperado en masas madres, aún así, se requiere de un control mensual por la posible contaminación de las harinas que contienen. El análisis consta de tres etapas:

- Pre-enriquecimiento en Selenito (incubación a 42 °C durante 24 horas), y Tetrionato (incubación a 37 °C durante 24 horas).
- Enriquecimiento en ASAP y XLD a 37 °C durante 24 horas. La formación de colonias rosas y negras con halo amarillo, respectivamente, podrían resultar ser consecuencia de la presencia de *Salmonella* en el producto.
- Confirmación con un sistema API.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La masa madre aún es un producto en desarrollo en la empresa en la que se ha desarrollado este TFM, por consiguiente, el proceso productivo se encuentra semiautomatizado y requiere de las acciones de un operario, quien, a través de un programa informático, pondrá en marcha el sistema de válvulas, bombas y fermentadores.

Algo esencial en su producción es el correcto mantenimiento de la instalación, ya que evitará posibles contaminaciones del producto.

5.1. Limpieza de la instalación

Esta operación se llevará a cabo tras su utilización y siempre que hayan transcurrido un número de horas superior a 8 sin haber sido usada.

La higienización es un proceso automatizado que se consigue gracias al sistema de limpieza “in situ” CIP (*Clean in Place*). Consiste en recircular la solución de limpieza a través de los componentes de la línea de proceso bajo determinadas condiciones de tiempo, temperatura, concentración y acción mecánica (Ryther, R. 2014), de manera que se realice una limpieza completa sin necesidad de desmontar ningún equipo.

Al tratarse de un circuito cerrado se pueden recuperar las soluciones empleadas con el fin de utilizarlas en limpiezas posteriores. El conductivímetro es un equipo esencial para el proceso de recuperación, ya que, a un nivel prefijado de conductividad, el sistema aceptará o no, la recuperación de la solución.

La fábrica de levadura cuenta con cuatro depósitos (CIPs fábrica), que contienen diferentes soluciones de limpieza (SL): sosa cáustica al 1.7 %, ácido nítrico al 1.5 %, hipoclorito sódico (60 ppm) y agua recuperada (que contiene restos de las soluciones anteriores) utilizada para realizar los primeros arrastres tras el proceso de producción. Cada uno de ellos posee una válvula para toma de muestra, un indicador de nivel, un medidor de conductividad y en el caso del depósito de sosa, un medidor y controlador de temperatura.

El tanque CIP del taller de masas madre es independiente a la instalación de levadura y la SL es impulsada desde el CIP correspondiente de fábrica, al que nunca podrá retornar. Esto es debido a que la elaboración de masa madre requiere el uso de harinas de cereales, que como las de trigo, contienen gluten. De la misma manera, los operarios están provistos de EPIs especiales para esta zona, con el fin de evitar cualquier tipo de contaminación cruzada en las instalaciones de levadura, puesto que son “gluten free”.

El depósito CIP presenta un sistema de calentamiento y un volumen mínimo de actuación. Si el depósito se encuentra totalmente vacío, la SL será impulsada desde fábrica, mientras que, si se encuentra parcialmente lleno o el líquido no alcanza el nivel mínimo del tanque, este podrá alimentarse accionando las llaves de paso de NaOH y AP, que aportarán una mezcla de NaOH al 25.0 % y agua, en la proporción adecuada para conseguir los parámetros de limpieza deseados.

La instalación de masas madre se encuentra conectada a un *software* a través del cual se inician los procesos de limpieza. En la pantalla de inicio aparece un listado en el que se diferencian los programas de producción de los programas de limpieza. Dentro de estos últimos, en “CIP Taller Masa Madre” se ajustan los parámetros de tiempo, temperatura, volumen de solución de limpieza y velocidad de trabajo de las bombas en función del tipo de limpieza a llevar a cabo. Para ello, el operario cuenta con un documento (*Anexo 1*) en el que se describen tales condiciones. Seguidamente, se ajusta el tipo de limpieza a realizar:

5.1.1. Limpieza completa

La limpieza completa comprende la totalidad del circuito, incluyendo el fermentador y la bomba mezcladora.

Al ser un proceso automatizado, previo a su programación se asegura que la totalidad de las válvulas y bombas se encuentren en modo automático y ninguna en “modo defecto”.

Se valorará el tiempo transcurrido desde la última limpieza efectuada. Si recientemente se ha completado un ciclo y se ha realizado la limpieza de forma adecuada, bastará con el uso de una solución alcalina que disuelva los restos de materia orgánica que hubiesen podido quedar retenidos a lo largo del circuito, como pueden ser proteínas, grasas y azúcares. Para ello, se emplean soluciones de hidróxido sódico (NaOH), a una concentración del 1.7 % y a una temperatura de 80 °C. Se seleccionará entonces la opción “enjuague-sosa-enjuague”.

Por otra parte, un excesivo uso de las instalaciones podría ocasionar la acumulación de calcificaciones, las cuales pueden ser degradadas con una solución de ácido nítrico al 1.5 %, a temperatura ambiente. Se acciona en este caso, la opción “enjuague-ácido-enjuague”. Esta operación se lleva a cabo, al menos, una vez por semana.

Siguiendo el orden de programación, se selecciona “sin agua inicial”, en el caso de que se haya efectuado una limpieza recientemente, de lo contrario, nos ayudará a eliminar la parte más “gruesa” de la suciedad acumulada y “mantener solución”, si esta se necesitase posteriormente.

A continuación, se establecen los tiempos de paso de las SL (*Anexo 1*) y se seleccionan las líneas de circulación, en este caso, “Línea de mezcla” y “Línea retorno CIP” pasando por el fermentador (DMM), la opción de “Marcha bomba mezcladora”, se valida la operación y se acciona el sistema.

Automáticamente, el fermentador realiza un pre-enjuague con agua de proceso, en el cual el agua es propulsada por la *bola de limpieza*, con la fuerza suficiente para limpiar las paredes internas del depósito y arrastrar los restos de producto que pudiese haber, eliminándolos por la purga.

Seguidamente la solución de limpieza es impulsada desde el depósito *CIP MM*, a través del *circuito de envío*, hasta el fermentador por medio de la *bola de limpieza*. El mecanismo de recirculación se basa en la regulación automática del flujo por las válvulas. El volumen de SL en el interior del fermentador oscila entre los 60 Kg y los 200 Kg, de tal manera que, una vez alcanzado el volumen máximo, la válvula inferior del tanque se abre dejando pasar el líquido por la *Línea de mezcla*, recirculando la solución. Cuando el fermentador se vacía por debajo del volumen mínimo, la posición de las válvulas cambia, se cierra el paso a la *Línea de mezcla* y se abre la entrada al fermentador, rellenándose de nuevo el depósito.

Una vez transcurrido el tiempo prefijado de paso de SL, la solución retorna al tanque CIP por la *Línea retorno CIP* y la instalación es nuevamente enjuagada con agua de proceso.

Completado cada paso de solución (ya sea paso de SL o AP), el sistema asegura su efectividad abriendo, por un período breve, los asientos de las válvulas localizadas a lo largo de las líneas implicadas, proceso conocido técnicamente como *flip-flop* (Ryther, R. 2014).

Finalmente, las válvulas de purga localizadas a lo largo del circuito se abren durante 5 minutos y el líquido sobrante cae al desagüe, lo cual se denomina “escurrido”.

Completado el procedimiento, el sistema se encuentra preparado para el inicio de un nuevo ciclo productivo. Un cambio en el color de la pantalla (se torna de un tono más claro), verificará la finalización de este proceso.

5.1.2. Limpieza de fin de ciclo

Limpiar las instalaciones tras un ciclo productivo evitará su deterioro y la acumulación de microorganismos indeseados que puedan interferir en el próximo ciclo.

Previa a la programación de una nueva limpieza completa, se tendrá en cuenta lo siguiente:

- Limpieza de la bomba mezcladora.

Un punto clave de limpieza son los tubos conectores de las tolvas con la bomba mezcladora, en los que han podido quedar restos de polvo. Para tratar de eliminarlo al máximo, se deberá retirar el cierre *clamp* y limpiar su interior con la precaución de no introducir agua ya que podrían obstruirse en el próximo ciclo de producción.

Otro elemento de especial interés es el “codo” de la bomba mezcladora, que conecta la *Línea de mezcla* con la bomba. La suciedad incrustada en esta pieza puede eliminarse con ayuda de una manguera de agua a presión.

- “Zonas muertas” del *manifold*.

Además, resulta interesante realizar un enjuague “extra” con agua de proceso por aquellas zonas del *manifold* de difícil acceso a la solución de limpieza, consiguiendo así arrastrar la suciedad acumulada.

- Limpieza de la Línea de carga.

De igual manera que en la limpieza completa, se programará la limpieza de la *Línea de Carga*, previo a la descarga del producto en el tanque.

5.2. Proceso productivo masa madre de trigo duro

Entre los diversos tipos de masa madre, la elaborada a base de harina de trigo duro es una de las más habituales en la empresa en la que desarrollé este trabajo fin de máster, por tanto, fue aquella en la que centramos el estudio.

Se trata de una masa madre conocida comercialmente con el nombre *LVBD3000*, correspondiéndose con sus siglas en francés, (*Levain Blé Dur*, masa madre de trigo duro) y se caracteriza por incluir en su formulación *starters* del género *Lactobacillus plantarum*, junto con levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

5.2.1. Preparación de la instalación

El proceso de elaboración de la masa madre es un proceso semiautomatizado. Su programación aún no es posible y la maquinaria es accionada a través del *software*, (tomando la precaución de que la totalidad de las válvulas y bombas implicadas en el proceso se encuentren en modo manual), mientras que la incorporación de los ingredientes al fermentador la realizará el operario manualmente.

5.2.2. Acondicionamiento del fermentador

El proceso se inicia con el llenado del fermentador con un pie de agua entre 33.5 °C y 35.5 °C. Para ello, se abre la llave de paso de AP que conecta con un intercambiador de calor, al que previamente se le ha prefijado dicha temperatura.

Una vez alcanzada la temperatura y el volumen del líquido deseados en el interior del tanque, se tomará una muestra del agua para analizar el nivel de cloro regulado en la dosificación, esperando obtener niveles de cloro libre entre 1.0 y 1.5 ppm, lo que permitirá mantener el control microbiano.

En este momento, el sistema se encuentra preparado para la adición gradual de los diferentes componentes a través de las tolvas que darán lugar al inicio de la fermentación. Para su correcta homogeneización, el líquido se mantiene en recirculación gracias al sistema de válvulas y bombas. En concreto, prima la actuación de la bomba mezcladora cuyo mecanismo propio de agitación, a velocidad y presión adecuadas, facilita la integración de las materias primas en formato polvo en la mezcla. La bomba mezcladora trabaja en condiciones de presión positiva mientras la mezcla se encuentre recirculando. Al adicionar los ingredientes, aumenta su velocidad de agitación y disminuye la presión de trabajo, con el fin de asegurar una correcta integración de los componentes.

5.2.3. Adición de los ingredientes

El primer aporte se realiza por la *tolva 1* y se compone de una mezcla de harinas: harina de trigo duro, harina malteada diastásica y extracto de levadura en polvo. Por acuerdos de confidencialidad con la empresa, se omiten las proporciones en las que los ingredientes son aportados.

La harina de trigo malteada diastásica proporciona el conjunto de enzimas necesarias para el incremento de la capacidad fermentativa, gracias a las cuales se consigue la cantidad de azúcares óptima para el desarrollo de la masa madre. El aporte de oligoelementos y vitaminas, no obstante, es proporcionado por el extracto de levadura.

La premezcla se mantiene en recirculación durante 15 minutos con la finalidad de consumir el cloro residual que pueda quedar en la mezcla.

A continuación, se incorpora el *starter* liofilizado, predisuleto en la mezcla de reacción. Para ello, se toma una muestra del fermentador y se disuelve el polvo liofilizado en la misma obteniendo una mezcla perfectamente homogénea que se añadirá al fermentador a través de la compuerta superior.

Una homogeneización de 30 minutos dará lugar a un pH ligeramente ácido, en torno a 6.0, lo cual se comprueba con un pHmetro.

Los *Lactobacillus* homofermentativos, como es el caso de *L. plantarum* producen una pequeña cantidad ácido acético, lo cual resulta insuficiente para la producción de masas

madre de calidad. Esto se solventa añadiendo acetato de sodio, que en un medio ácido reaccionará con los protones libres en disolución dando lugar a ácido acético.

No obstante, el grupo *Lesaffre* se encuentra trabajando en la sustitución de estos microorganismos incorporando bacterias de tipo heterofermentativo, *Lactobacillus brevis*, capaces de producir cantidades considerables de ácido acético, lo cual se aproximaría en mayor grado a un producto de “etiqueta limpia”.

Por la *tolva 2* (de diámetro inferior a la 1), junto con el acetato sódico se adiciona sal de cloruro potásico.

De nuevo se espera a que los minerales se estabilicen durante 30 minutos. Transcurridos los cuales, se controlará que el pH se encuentre próximo a los niveles de la etapa anterior.

A continuación, se añade una segunda fracción de harina de trigo duro, superior en peso a la inicial, por la *tolva 1*, con lo que se concluye el aporte total de ingredientes necesarios para la formación de la masa, marcando el inicio de la fermentación, conocido como “tiempo 0”.

El producto que queda a lo largo de las tuberías a consecuencia de la recirculación es arrastrado con agua de proceso hacia el fermentador hasta alcanzar el volumen de producto deseado. El exceso del mismo es drenado por las válvulas de purga.

5.2.4. Proceso fermentativo

La mezcla se mantendrá en agitación durante todo el proceso fermentativo, lo cual evitará la decantación de las harinas y favorecerá la transmisión térmica dentro de la masa (Antoja, F. J. 2015). A lo largo de la fermentación se irán produciendo los ácidos responsables de la disminución del pH del medio.

5.2.5. Características aromáticas

Para conseguir el mayor desarrollo organoléptico, se añade a la mezcla, por la compuerta del fermentador, la cantidad necesaria de levadura seca, (cepa panadera de *S. cerevisiae*), disuelta en agua destilada. De forma simbiótica, bacterias ácido-lácticas y levaduras, incentivarán el desencadenamiento de compuestos aromáticos característicos. Estos microorganismos se añaden a un pH inferior a 5.0, factor indicativo de que la cantidad de ácidos orgánicos producidos por las BAL comienza a ser elevada. El hecho de añadir la levadura en este punto y no al inicio de la fermentación, evitará la competencia microbiana frente a las bacterias ácido-lácticas por los azúcares presentes

en la harina, en la que primarían las levaduras y como consecuencia, la producción de ácidos se vería reducida. La actividad de la levadura también puede verse condicionada por la presencia de sales en el medio.

5.2.6. Acondicionamiento del producto

Por último, con el fin de evitar la decantación de las harinas durante el acondicionamiento del producto, se adiciona goma xantana, que absorberá el exceso de agua provocando un aumento de la viscosidad de la masa. Para conseguir una mezcla homogénea, se debe imponer de nuevo el sistema de recirculación con una velocidad superior abriendo, a través del *software*, las válvulas pertinentes.

Aprovechando la estabilidad térmica del hidrocoloide, previo a su adición, se acondiciona la mezcla a unos 10 °C. De esta manera, nos acercamos a las condiciones de almacenamiento.

El aditivo se añade por la *tolva* 2 y la mezcla se mantiene en recirculación durante 40 minutos, con el fin de alcanzar un valor de viscosidad óptimo. Es aquí donde interfieren los iones de Na⁺ contribuyendo positivamente a la formación del gel.

Superado este tiempo, se detiene la recirculación y con ayuda de agua de proceso se recupera el producto que hubiese podido quedar retenido a lo largo del circuito, drenando el exceso por las válvulas de purga.

5.2.7. Control del proceso productivo

El principal parámetro de seguimiento del proceso de elaboración de masas madre es el índice de acidez, el cual se cuantifica como nivel de pH o ATT. La medida de pH se lleva a cabo con una periodicidad de 60 minutos durante las primeras horas, hasta alcanzar el pH óptimo de adición de la levadura. Transcurrido este tiempo, se repetirá la medición cada 8 horas hasta completar el proceso fermentativo. No obstante, el primer control de ATT relevante es el realizado pasadas las primeras 8 horas de fermentación, puesto que el contenido en ácidos orgánicos ya será considerable. Posteriormente, se realizarán controles cada 8 horas hasta el final del ciclo.

Aunque la estandarización se haya realizado únicamente sobre masa madre *LVDB3000*, la empresa nos proporcionó los datos necesarios para el estudio del perfil fermentativo de masas madre de idéntica formulación pero, elaboradas con un *starter* adquirido a un segundo proveedor, proveedor B, así como de masas madre de formato

más diluido (*LVDB3000diluida*, elaboradas con *starters* tanto del proveedor A, como del B), con un porcentaje de harina reducido a la mitad con respecto al primer formato.

Un proceso fermentativo bajo control será aquel en el que los valores de acidez a lo largo de un ciclo productivo se encuentren dentro de los límites establecidos como resultado de la recopilación de los datos obtenidos en ciclos anteriores.

En las tablas 1 y 2, se presentan los datos promedios de medidas de pH y ATT tomadas a diferentes tiempos de fermentación a lo largo de al menos, tres ciclos productivos de masas madre *LVDB3000* y *LVDB3000diluida*.

Tabla 1. Datos para la construcción de gráficos de control de un ciclo productivo de masas madre de trigo duro elaboradas con starters del proveedor A. LCS, (Límite de Control Superior); LCI, (Límite de Control Inferior); ATT, (Acidez Total Titulable).

t (h)	LVDB3000						LVDB3000diluida					
	pH			ATT			pH			ATT		
	LCS	pH	LCI	LCS	ATT	LCI	LCS	pH	LCI	LCS	ATT	LCI
0	6.24	6.10	5.96	0.69	0.05	-0.59	8.02	6.24	4.45	2.09	0.54	-1.01
2	5.84	5.70	5.56				7.38	5.60	3.81			
3	5.47	5.33	5.18				6.95	5.17	3.38			
4	5.14	5.00	4.85				6.54	4.76	2.98			
8	4.49	4.35	4.21	13.22	12.59	11.95	5.89	4.11	2.32	9.97	8.42	6.87
16	4.22	4.08	3.94	16.01	15.37	14.73	5.65	3.87	2.09	12.88	11.33	9.78
24	4.16	4.02	3.87	17.22	16.58	15.94	5.58	3.80	2.02	13.55	12.00	10.45
32	4.15	4.01	3.86	17.71	17.08	16.44	5.56	3.78	1.99	14.07	12.52	10.97
37	4.12	3.98	3.83	17.64	17.00	16.36	5.57	3.79	2.01	14.18	12.63	11.07

Tabla 2. Datos para la construcción de gráficos de control de un ciclo productivo de masas madre de trigo duro elaboradas con starters del proveedor B. LCS, (Límite de Control Superior); LCI, (Límite de Control Inferior); ATT, (Acidez Total Titulable).

t (h)	LVDB3000						LVDB3000diluida					
	pH			ATT			pH			ATT		
	LCS	pH	LCI	LCS	ATT	LCI	LCS	pH	LCI	LCS	ATT	LCI
0	6.42	6.29	6.17	3.09	0.08	-2.93	6.60	6.35	6.10	2.53	0.32	-1.88
2	6.36	6.23	6.11				6.48	6.24	5.99			
3	6.28	6.15	6.03				6.32	6.08	5.83			
4	5.99	5.86	5.74				6.04	5.80	5.55			
5	5.65	5.53	5.40				5.59	5.34	5.09			
8	4.69	4.56	4.44	13.09	10.08	7.07	4.55	4.30	4.05	10.23	8.03	5.82
16	4.18	4.06	3.93	17.15	14.14	11.12	4.11	3.87	3.62	13.33	11.13	8.92
24	4.10	3.97	3.85	18.88	15.87	12.86	4.01	3.76	3.51	15.07	12.86	10.66
32	4.06	3.93	3.81	19.64	16.63	13.61	3.96	3.72	3.47	15.68	13.48	11.28
37	4.04	3.91	3.78	19.81	16.80	13.79	3.95	3.71	3.46	15.86	13.66	11.45

La representación de tales datos da lugar a los “gráficos de control” o “gráficos de Shewart”, que facilitarán la rápida detección de las posibles desviaciones del proceso de los próximos ciclos productivos a realizar (*Anexo 2*).

Los “gráficos de *Shewart*” más sencillos constan de tres líneas horizontales. Una línea central, LC, resultado de la representación del promedio de las medidas realizadas a cada punto, y dos límites de control, superior (LCS), e inferior (LCI), que encierran el intervalo en el cual está permitido que los valores oscilen, localizados a $\mu \pm k\sigma$, siendo σ , la desviación típica del conjunto de valores, y $k=3$, aceptando un nivel de confianza de $p= 0.9974$. Aunque en este caso los límites fueron ligeramente modificados de acuerdo a los requerimientos de la empresa.

Análisis de los resultados

- Control de pH

En un ciclo fermentativo la acidez irá aumentando conforme avance el tiempo hasta comenzar a estabilizarse pasadas las 15 horas, lo cual indica la proximidad al punto final del proceso. No obstante, la mezcla continúa fermentando hasta completar 36 ó 40 horas, de acuerdo con el factor limitante de los azúcares disponibles en la masa, (*Figura A2.1. del Anexo 2*). Además, se ha observado que el perfil de acidez varía en función del *starter* utilizado en el proceso. La superposición de los ciclos nos ayuda a establecer estas diferencias, (*Figura 2*).

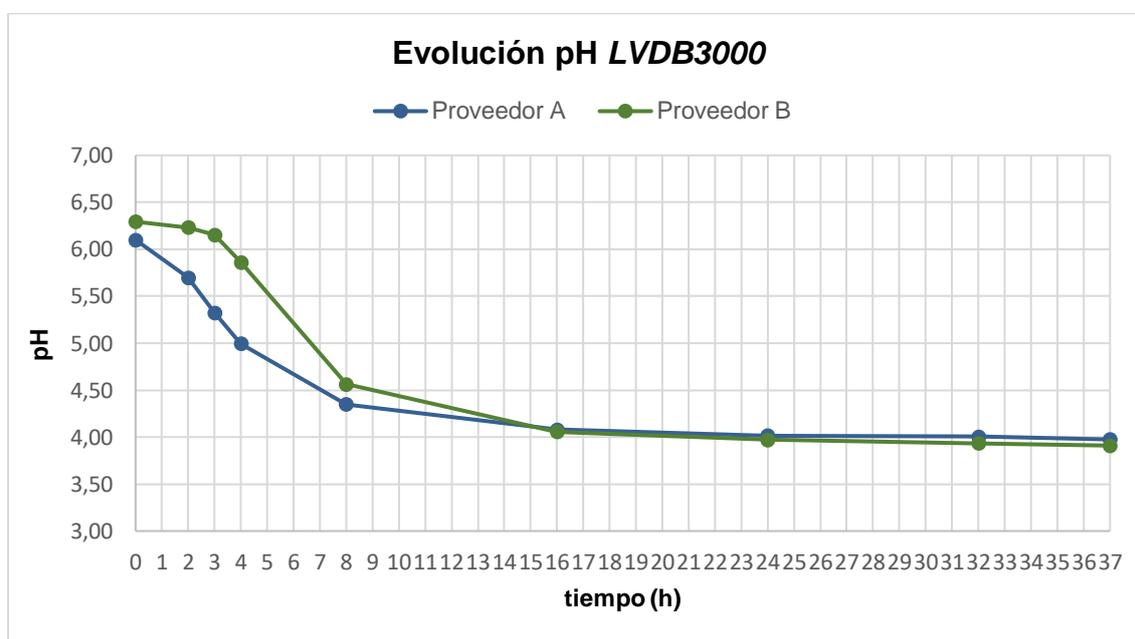


Figura 2. Influencia del starter en la evolución del pH a lo largo de un ciclo productivo de masa madre LVDB3000.

Vista la *Figura 2* podemos afirmar que la fase de latencia de los *starters* suministrados por el proveedor B, se prolonga más en el tiempo con respecto a la de los proporcionados por el proveedor A, que provocan una variación de pH mucho más pronunciada alcanzándose niveles de acidez superiores en un menor intervalo temporal.

Siendo *starters* del mismo tipo (*L. plantarum*), y cepa, y tras comprobar en ocasiones anteriores que el número de células activas es idéntico, se concluye que las diferencias entre ambos podrían radicar en el proceso de liofilización llevado a cabo sobre los microorganismos en cada empresa proveedora.

Otro aspecto de interés para futuros proyectos en *Lesaffre*, es incrementar el grado de humedad en la fórmula, ya que se ha demostrado científicamente que en masas más fluidas los nutrientes son mejor aprovechados por las bacterias ácido-lácticas, lo que se traduce en una acidez superior, y por tanto, un mayor rendimiento fermentativo (Antoja, F. J. 2015). Si analizamos la tendencia del pH a lo largo de un ciclo productivo de masas madre de trigo duro, frente a las correspondientes diluídas al 50.0%, se observa que en el segundo caso se alcanzan niveles de acidez ligeramente superiores (Figura 3), aunque, esta tendencia puede observarse con mayor claridad en un análisis de ATT.

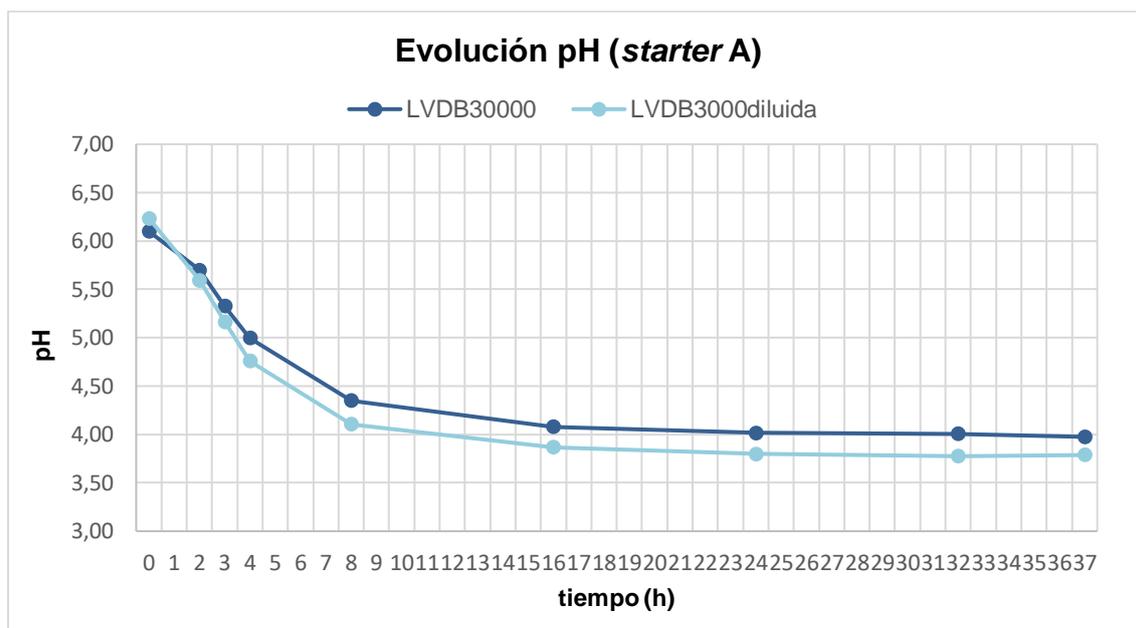


Figura 3. Influencia del grado de humedad en la evolución del pH a lo largo de un ciclo productivo de masas madre LVDB3000 elaboradas con starters del proveedor A.

En cuanto a la comparativa entre masas madre de formatos normal y diluído elaboradas con el *starter* proporcionado por el proveedor B, no se encontraron diferencias con respecto a los resultados representados en la Figura 3, (ciclo productivo de masa madre elaborada con starters del proveedor A).

Aunque la dilución puede ser un aspecto positivo en la producción de masa madre, el porcentaje de humedad no puede acrecentarse de manera indeterminada, ya que se tendría que valorar en conjunto el grado de afectación de las características de la masa.

- Análisis de ATT

El grado de acidez en la mezcla puede cuantificarse rápidamente con una medida de pH, ya que resulta ser una consecuencia del incremento de la concentración de ácidos en el medio. Sin embargo, a niveles de acidez elevados, el pH varía mínimamente conforme aumenta la acidez, mientras que la ATT incrementa de manera proporcional, por tanto, este último parámetro nos proporcionará una mayor información.

La evolución del ATT a lo largo de la fermentación se representa en la *Figura A2.2.* del *Anexo 2.*

La tendencia observada es que la ATT incrementa hasta aproximadamente $t= 20$ horas, que comienza a estabilizarse. Sin embargo, en formulaciones preparadas con *starter* del proveedor B, la estabilización se consigue próximo a las 24 horas del inicio de la fermentación. La comparativa puede observarse en la *Figura 4.*

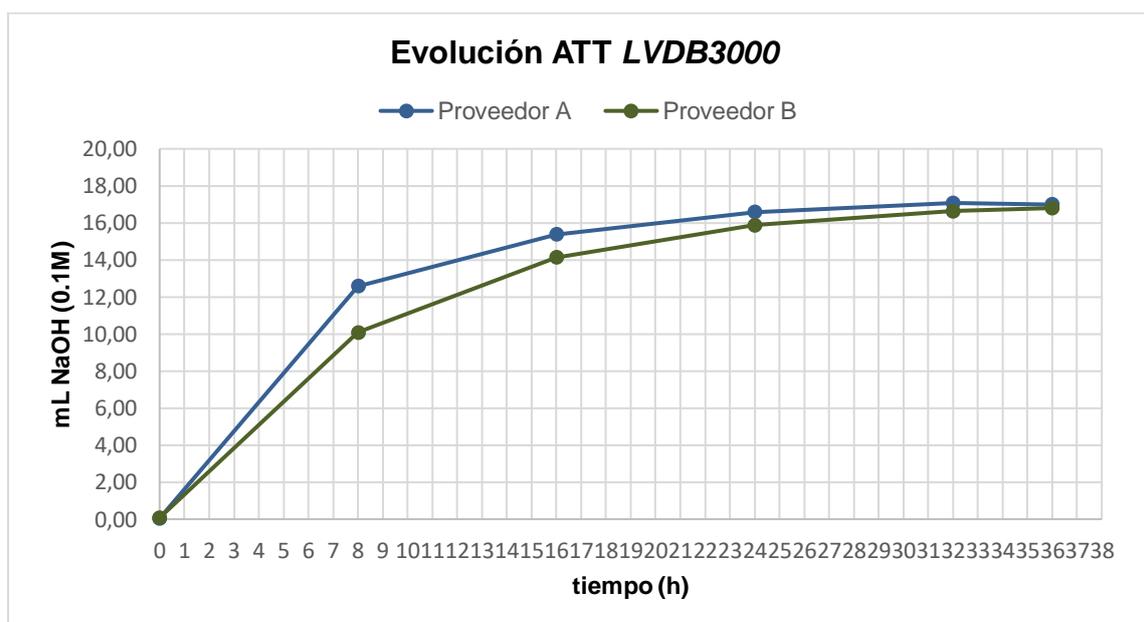


Figura 4. Influencia del starter en la evolución del ATT a lo largo de un ciclo productivo de masa madre LVDB3000.

Estas diferencias, parecen ser menos acusadas en formulaciones más diluidas, (*Figura 5*).

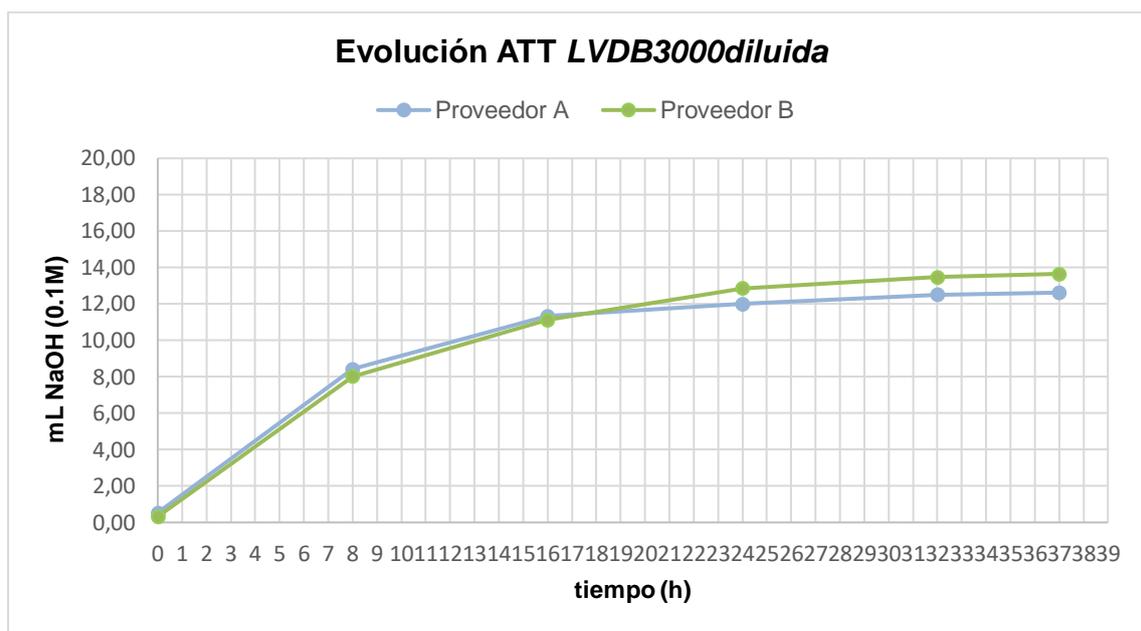


Figura 5. Influencia del starter en la evolución del ATT a lo largo de un ciclo productivo de masa madre LVDB3000diluida.

En cuanto a las diferencias entre fórmulas con diferente grado de humedad, el nivel de acidez es superior para el caso de la diluida con relación al porcentaje inicial de harina en la mezcla, verificándose así la afirmación de Antoja, (Figuras 6 y 7). Esta diferencia es más acusada, de nuevo, en ciclos realizados con microorganismos del proveedor A.

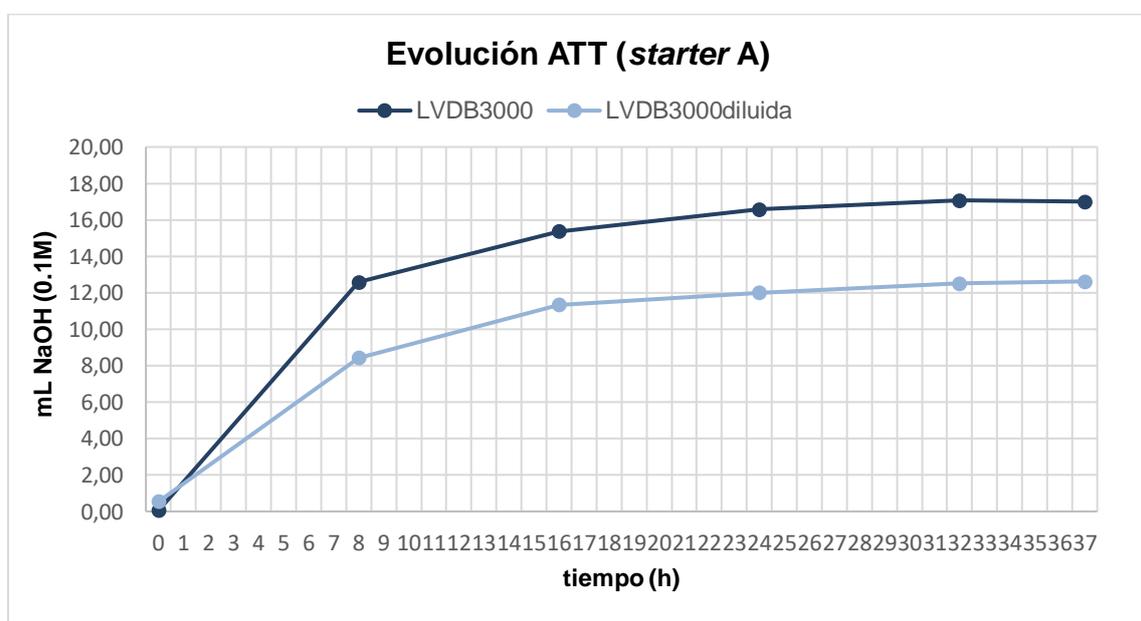


Figura 6. Influencia del grado de humedad en la evolución del ATT a lo largo de un ciclo productivo de masas madre LVDB3000, elaboradas con starters del proveedor A.

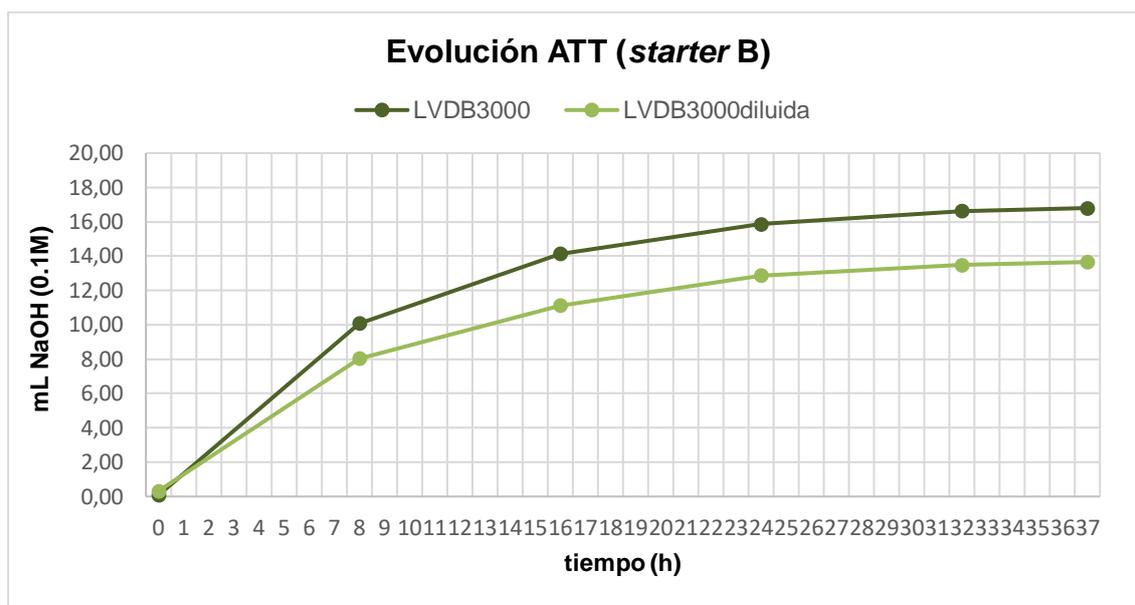


Figura 7. Influencia del grado de humedad en la evolución del ATT a lo largo de un ciclo productivo de masas madre LVDB3000, elaboradas con starters del proveedor B.

Análisis microbiológicos

Al igual que los análisis fisicoquímicos, el control microbiológico se lleva a cabo a tiempos estipulados a lo largo del proceso (t= 0, 8, 36 horas).

Tanto a t= 0 horas como a t= 8 horas se analizan coliformes totales, que nos dan idea de las condiciones higiénicas de la instalación, y bacterias lácticas indicativas de la efectividad de los lactobacilos y el grado de evolución del proceso. Sobre el producto final, se llevan a cabo, además, análisis de coliformes más específicos (fecales y *E. coli*), cuantificación de levaduras y mohos y se descarta la aparición de *Salmonella*.

Análisis de azúcares residuales.

Como se indicó en el epígrafe introductorio, el factor limitante del proceso es la harina, que proporcionará a los microorganismos los azúcares fermentables para la producción de los ácidos orgánicos. Un análisis cromatográfico, vía UPLC, reveló una cantidad inferior a 0.5 g por 100 g de masa madre LVDB3000, de monosacáridos tales como sacarosa, galactosa, glucosa y fructosa y un contenido ligeramente superior en maltosa (2.6 g / 100 g) tras 36 horas de fermentación, lo que verifica la finalización del ciclo fermentativo.

Cociente de Fermentación.

Sobre el producto final se ha analizado cromatográficamente la concentración de los ácidos láctico y acético, obteniéndose un cociente de fermentación elevado, puesto que el contenido en ácido acético es la tercera parte del contenido en láctico (0.5 g de ácido acético frente a 1.5 g de ácido láctico), lo que verifica la calidad organoléptica del producto.

5.3. Acondicionamiento del producto

Finalizado el proceso productivo, la masa madre está lista para trasvasarse a los diferentes formatos de venta:

- Tanque de 1000.0 Kg.
- Garrafa de 5.0 Kg.
- Sobres de 40.0 g, para los que se prescinde del estabilizante con el fin de dar una imagen de “etiqueta limpia”.

Una medida de seguridad alimentaria en esta acción es la detección de cuerpos extraños a la salida de la línea de carga, por lo que esta cuenta con un filtro de tamaño de partícula de 500 µm en el que quedarían retenidos, evitando su llegada al contenedor final.

5.4. Mantenimiento de la calidad de las masas madre.

La elevada acidez del producto no es sólo una característica sensorial, sino que también se trata de una funcionalidad tecnológica, como es la capacidad conservante, por lo que se espera que la contaminación por flora microbiana indeseable sea de 0 UFC /g en coliformes y ausencia de *Salmonella* en 25.0 g de muestra para la obtención de un producto seguro según las recomendaciones sanitarias.

La consistencia de la masa, aunque es un parámetro orientativo, será útil tenerlo en cuenta. Se ha visto que viscosidades de entre 2.7 y 3.5 Pa·s, resultan ser óptimas para el manejo de las masas en las actividades panaderas.

Por último, la estabilidad del producto a lo largo del tiempo resulta ser un parámetro de calidad de las masas madre, así, su almacenamiento en refrigeración (entre 2 °C y 3 °C), permite minimizar la actividad biológica y enzimática de los microorganismos presentes y extender su vida útil hasta hasta un mínimo de 14 semanas.

6. CONCLUSIONES

Acorde a los objetivos planteados, se concluye lo siguiente:

- La puesta en marcha y validación del procedimiento de limpieza implantado asegura la mejora continua del proceso de estandarización, ya que permite detectar y corregir los posibles fallos cometidos.
- La implantación del procedimiento de producción de masa madre de trigo duro resulta de la corrección de las deficiencias detectadas en la validación del proceso descrito en el epígrafe 5.2..
- La producción gradual de ácidos orgánicos conlleva al descenso progresivo del pH hasta alcanzar valores por debajo de 4.0, lo que mantiene el proceso bajo control fisicoquímico y microbiológico.
- La estabilización de la ATT indica la proximidad a la finalización del proceso fermentativo, lo cual se demuestra con la ausencia de azúcares residuales revelada en un análisis cromatográfico realizado sobre una muestra de producto tras 36 horas de fermentación.
- En términos de efectividad, resulta más adecuado el uso de starters *L. plantarum* suministrados por el proveedor A para la producción de masa madre *LVDB3000*, ya que se consigue la estabilidad del producto a las 20 horas aproximadamente, frente a las 24 horas que tarda el producto elaborado con el suministrado por el proveedor B. El uso del primero permitirá, por tanto, acortar el tiempo de un ciclo productivo.
- Una dilución de la masa madre *LVDB3000* al 50.0 % acelera la producción de ácidos orgánicos por los microorganismos presentes en la masa, acortándose así los tiempos de producción y permitiendo el ahorro en materias primas. Un porcentaje de dilución superior podría producir una disminución de la funcionalidad tecnológica o de las características organolépticas de la masa.

7. REFERENCIAS

- Antognoni, F.; Mandrioli, R.; Potente, G.; Taneyo Saa, D.; Gianotti, A. (2019). Changes in carotenoids, phenolic acids and antioxidant capacity in bread wheat doughs fermented with different lactic acid bacteria strains. *Food Chemistry*, 292, 211-216.
- Antoja, F. J. (2015). *Masas madre: elaboración y utilización*. Barcelona: Montagud editores.
- Real Decreto 308/2019, de 26 de abril, por el que se aprueba la norma de calidad para el pan. Recuperado de <https://www.boe.es/boe/dias/2019/05/11/pdfs/BOE-A-2019-6994.pdf> BOE-A-2019-6994.
- Da Min, P.; Jae-Han, B.; Min Soo, K.; Hyeontae, K.; Shin Dal, K.; Sangmin, S.; Deukbuhm, L.; Jin-Ho, S.; Hee, K.; Nam Soo, H. (2019). Suitability of *Lactobacillus plantarum* SPC-SNU 72-2 as a Probiotic Starter for Sourdough Fermentation. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 1729-1738.
- Dewettinck, K.; Van Bockstaele, F.; Kühne, B.; Van de Walle, D.; Courtens, T.; Gellynck, X. (2008). Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 243-257.
- Figueroa-González, I. (2011). Probiotics and prebiotics- perspectives and challenges. *Journal of Scientific Agriculture*, 1341-1348.
- Gil, Á.; Serra, L. (2010). Libro Blanco del Pan. Editorial Médica Panamericana.
- León, P.; Montoya, C.; Motato, K.; Granda, D.; Acaro C.; Restrepo, J. Echeverri, S.; Valencia, J.; Quinchía, L. (2006). Bacterias ácido lácticas (BAL) silvestres colombianas presentan propiedades adecuadas para la fabricación de masa madre ácida. *Revista de la facultad de química farmacéutica, Medellín-Colombia*, 26-35.
- Garrido, M. El secreto del pan elaborado a partir de masa madre de cultivo. Recuperado de: <https://tecnosa.es/el-secreto-del-pan-elaborado-partir-de-masa-madre-de-cultivo/> (Fecha consulta: Octubre 2020).
- Martorana, A.; Giuffrè, A.; Capocasale, M.; Zappia, C.; Sidari, R. (2018). Sourdoughs as a source of lactic acid bacteria and yeasts with technological characteristics useful for improved bakery products. *European Food Research and Technology*, 244 (10), 1873-1885.
- Parra, R. (2010). Review. Bacterias ácido-lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia*, 8(1), 93-105.
- Vogel, R.; Knorr, R.; Muller, M. (1999). Non-dairy lactic fermentations: the cereal world. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 403-411.
- Ryther, R. (2014). Development of a Comprehensive Cleaning and Sanitizing Program for food Production Facilities. *Food Safety Management*, 27, 741-768, Academic press.
- Tebben, L.; Shen, Y.; Li, Y. (2018). Improvers and functional ingredients in whole wheat bread: A review of their effects on dough properties and bread quality. *Trends in Food Science and Technology*, 81, 10-24.
- Winters, M.; Panayotides, D.; Bayrak, M.; Rémont, G.; Viejo, C.; Liu, D.; Liu, J.; Luo, J.; Zhang; Howell, K. (2019). Defined co-cultures of yeast and bacteria modify the aroma, crumb and sensory properties of bread. *Journal of Applied Microbiology*, 127(3), 778-793.
- Yang, H.; Liu, T.; Zhang, G.; He, G. (2020). Intraspecific diversity and fermentative properties of *Saccharomyces cerevisiae* from Chinese traditional sourdough. *LWT-Food Science and Technology*, 124, 109195.

ANEXO 1. Condiciones de limpieza de la instalación de producción de masas madre.

1. Programación de la limpieza

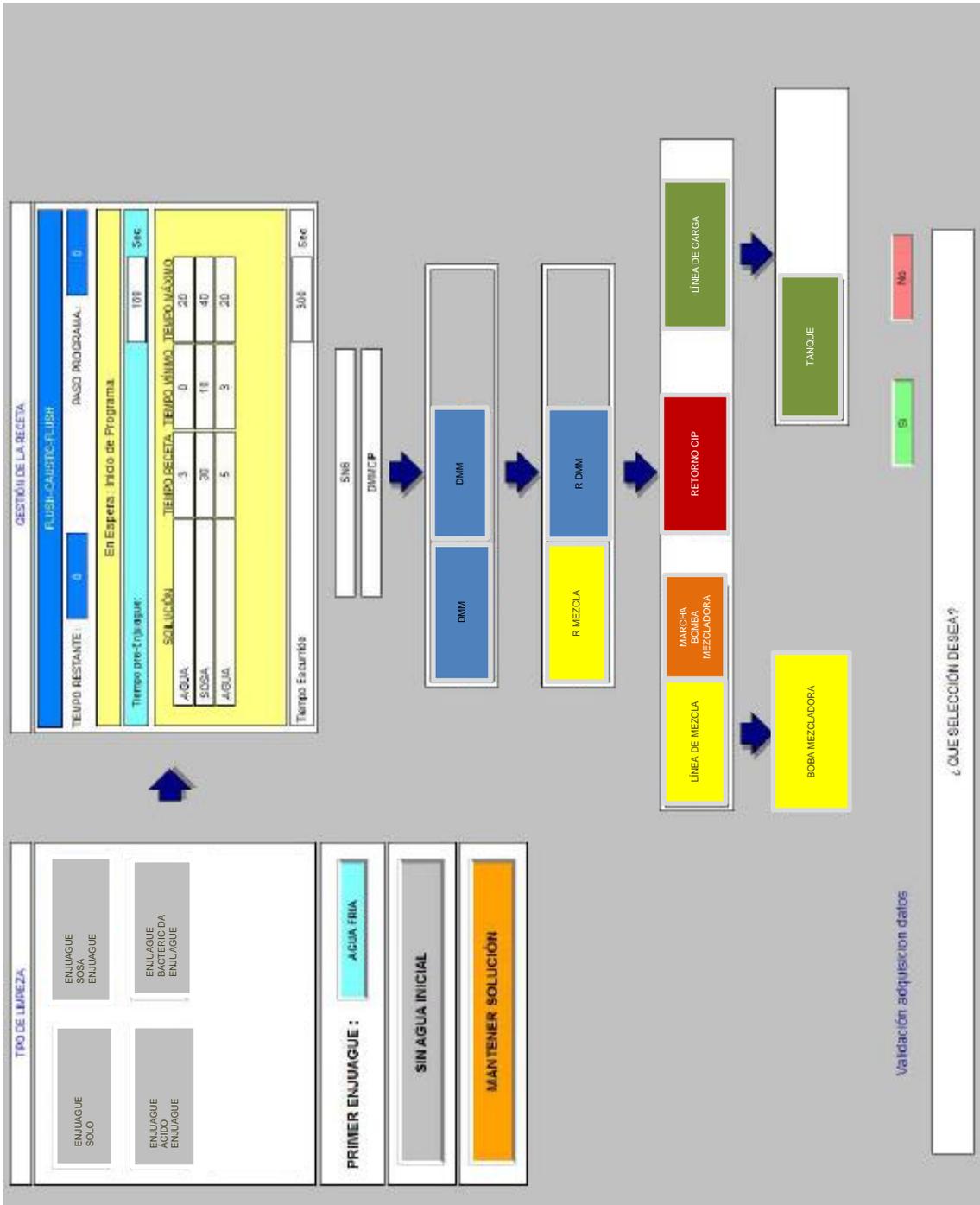


Figura A1.1. Pantalla de programación de limpieza de la instalación de masas madre.

Tabla A1.1. Parámetros de limpieza generales. SL, (Solución de Limpieza); RSL, (Retorno Solución de Limpieza); CIP, (Clean in Place).

CIP3 Depósito(s) o/y Línea(s) MD MDC MDCS		
Tiempo retardo marcha bomba(s) SL	5	s
Tiempo retardo marcha bomba(s) RSL	5	s
Tiempo FlipFlop purgas	3	s
Tiempo FlipFlop Manifold	2	s
Temperatura marcha CIP	60.0	°C
Temperatura Solución NaOH	75.0	°C
Volumen marcha CIP	0.600	m ³
Volumen Solución	2.000	m ³
Volumen Empuje Solución	0.800	m ³
Velocidad Bombas Depósitos	50	%
Velocidad Bomba Mezcladora	800	rpm
Valores por defecto <input type="checkbox"/>		

2. Soluciones de limpieza, SL:

Las soluciones de limpieza son impulsadas desde los CIP de fábrica al CIP del Taller de Masas Madre:

CIP fábrica

Tabla A1.2. Condiciones CIP de fábrica. T, (temperatura); σ , (conductividad).

CIP	NaOH	HNO ₃
T (°C)	80	25
σ (mS)	80	80
Concentración (%)	1.7	1.5

En caso de que el depósito CIP de masa madre no alcance el nivel mínimo del tanque, (1200Kg), o se requiera reponer un volumen de SL, se puede realizar de manera manual a la ratio de 5L de sosa, de una disolución al 25.0%, por cada 100L de agua.

3. Tipos de limpieza

3.1. Limpiezas

Tabla A1.3. Tiempos de limpieza según la solución de limpieza a utilizar y la línea escogida. SL, (Solución de Limpieza); AP, (Agua de Proceso).

Tipo de limpieza	Limpieza completa NaOH		Limpieza completa HNO ₃	Limpieza línea de carga
	partiendo de <u>instalación limpia</u>	partiendo de <u>instalación sucia</u>		
pre-enjuague, t (min)	3	3	3	
enjuague con AP, t (min)	3	3	3	3
paso SL, t (min)	30	40	20	30
enjuague con AP, t (min)	3	3	3	3
escurrido, t (min)	5	5	5	5

3.2. Enjuagues con AP por las zonas del *manifold* de difícil acceso a la SL, (paso de solución por *Línea de mezcla* y *Línea de Retorno CIP*).

Tabla A1.4. Tiempos de paso AP. SL, (Solución de Limpieza); AP, (Agua de Proceso).

Enjuagues con AP	Tras paso SL	Tras un ciclo productivo
pre-enjuague, t (min)	3	3
paso AP, t (min)	1	3
escurrido, t (min)	5	5

ANEXO 2. Gráficos de Shewart para el control del proceso productivo de masas madre.

1.1. Perfil de acidez del proceso productivo de masas madres elaboradas con starters del proveedor A.

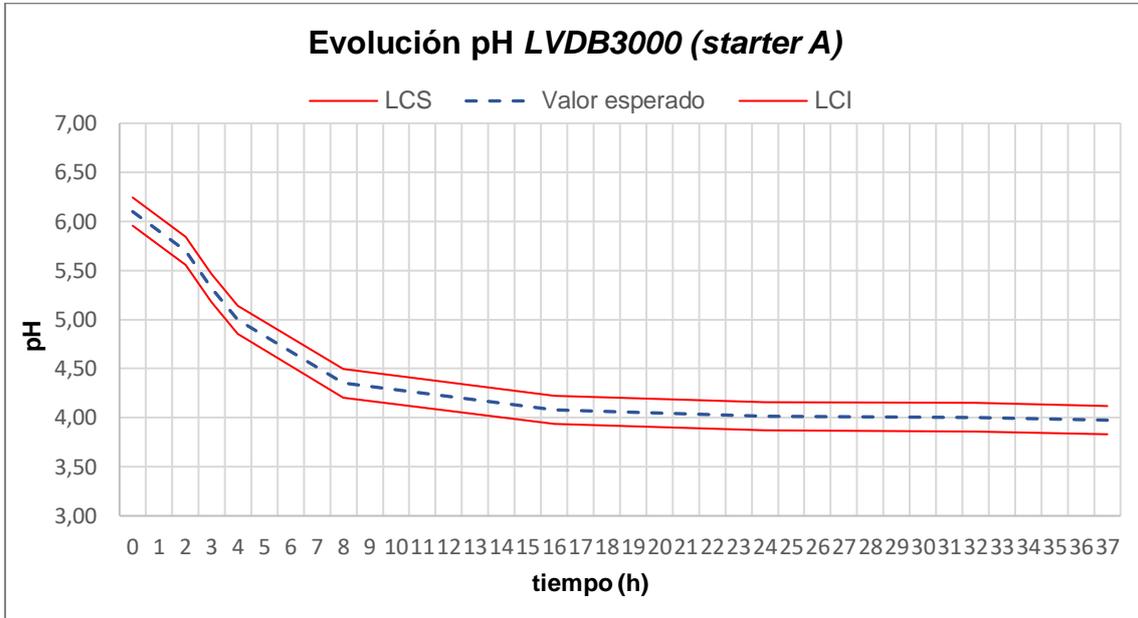


Figura A2.1. Gráfico de Shewart para el control de pH a lo largo de un ciclo productivo de LVDB3000, (elaborada con starter del proveedor A). LCS, (Límite de Control Superior); LCI, (Límite de Control Inferior).

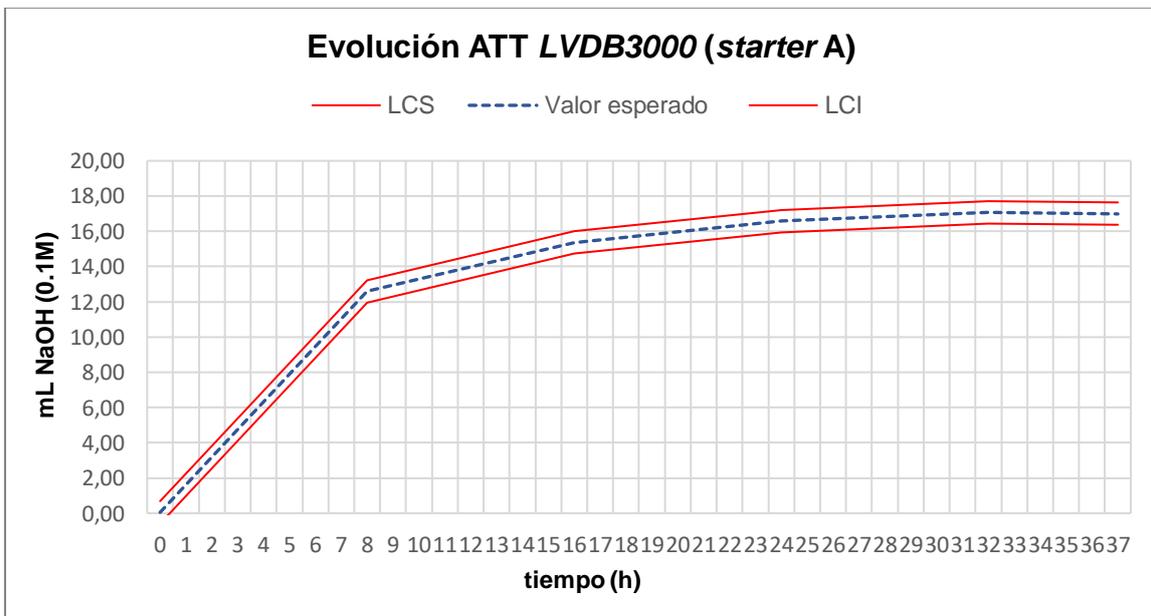


Figura A2.2. Gráfico de Shewart para el control de ATT a lo largo de un ciclo productivo de LVDB3000, (elaborada con starter del proveedor A). LCS, (Límite de Control Superior); LCI, (Límite de Control Inferior).

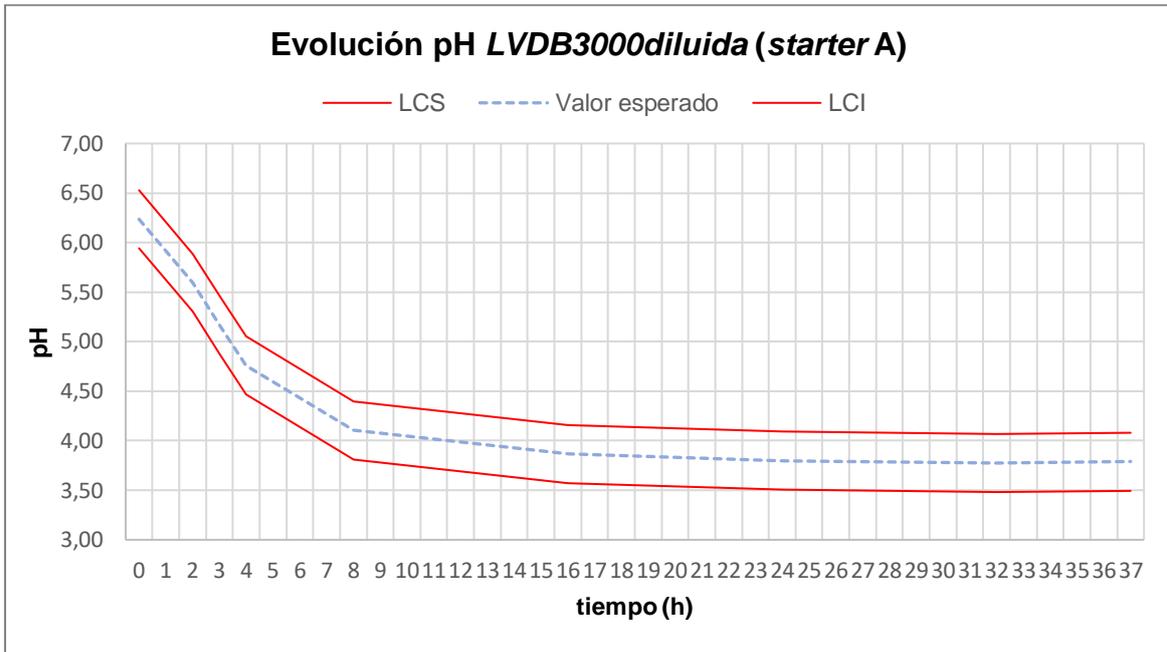


Figura A2.3. Gráfico de Shewart para el control de pH a lo largo de un ciclo productivo de LVDB3000diluida, (elaborada con starter del proveedor A). LCS, (Límite de Control Superior); LCI, (Límite de Control Inferior).

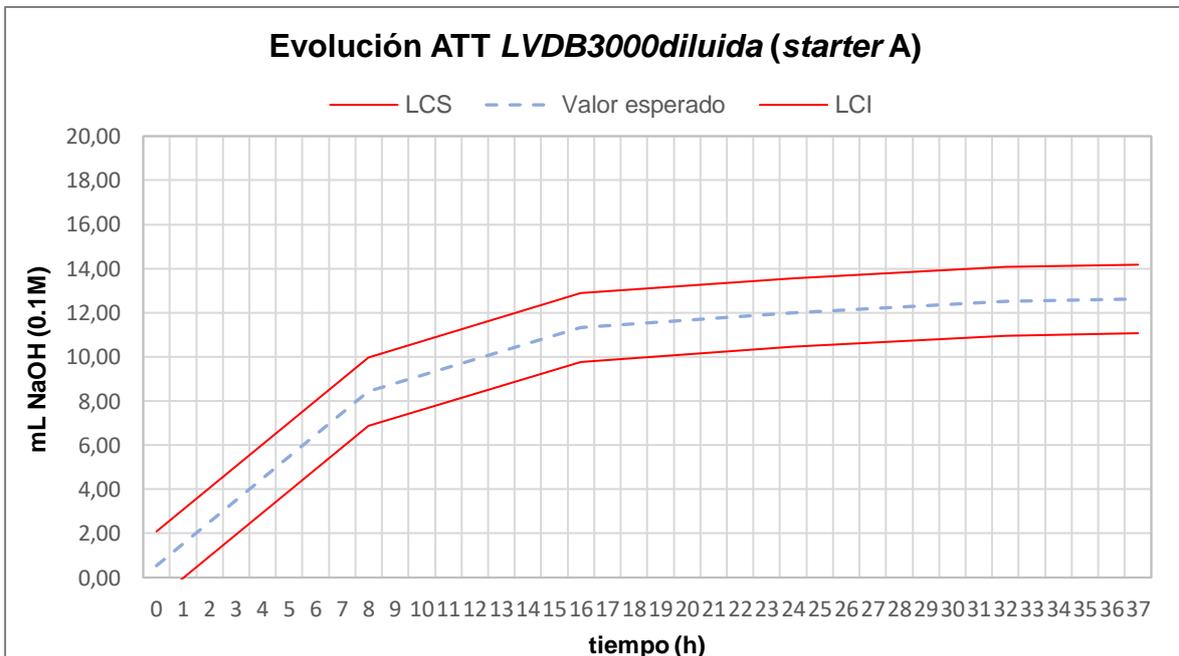


Figura A2.4. Gráfico de Shewart para el control de ATT a lo largo de un ciclo productivo de LVDB3000diluida, (elaborada con starter del proveedor A). LCS, (Límite de Control Superior); LCI, (Límite de Control Inferior).

1.2. Perfil de acidez del proceso productivo de masas madres elaboradas con starters del proveedor B.

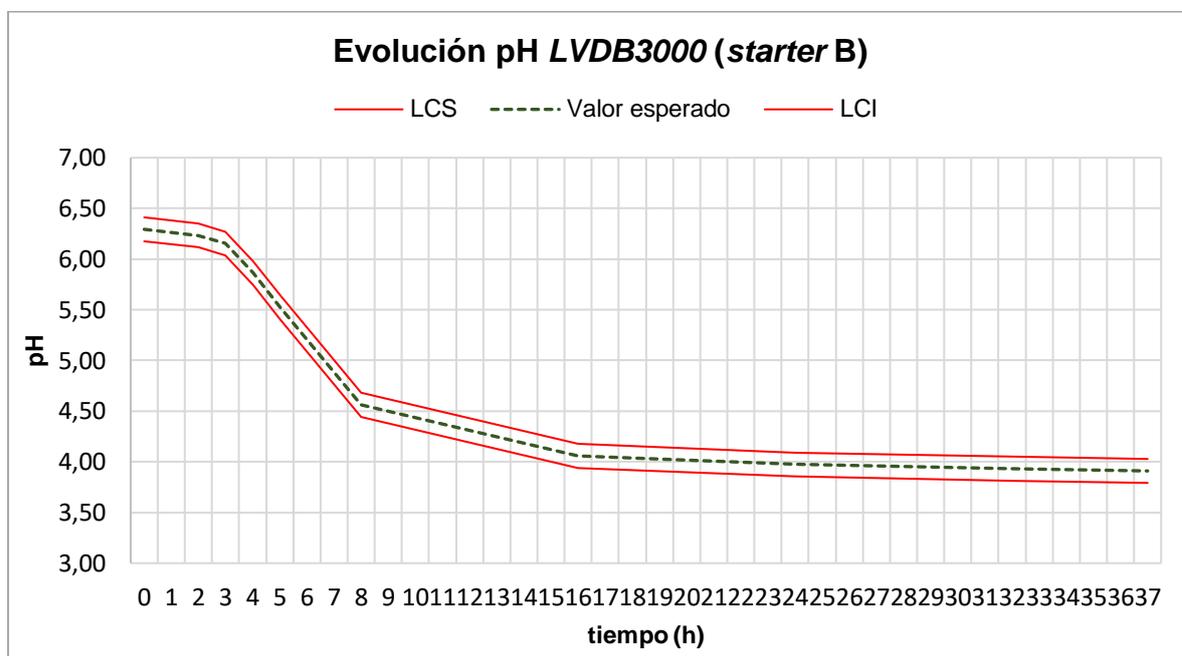


Figura A2.5. Gráfico de Shewart para el control de pH a lo largo de un ciclo productivo de LVDB3000, (elaborada con starter del proveedor B). LCS, (Límite de Control Superior); LCI, (Límite de Control Inferior).

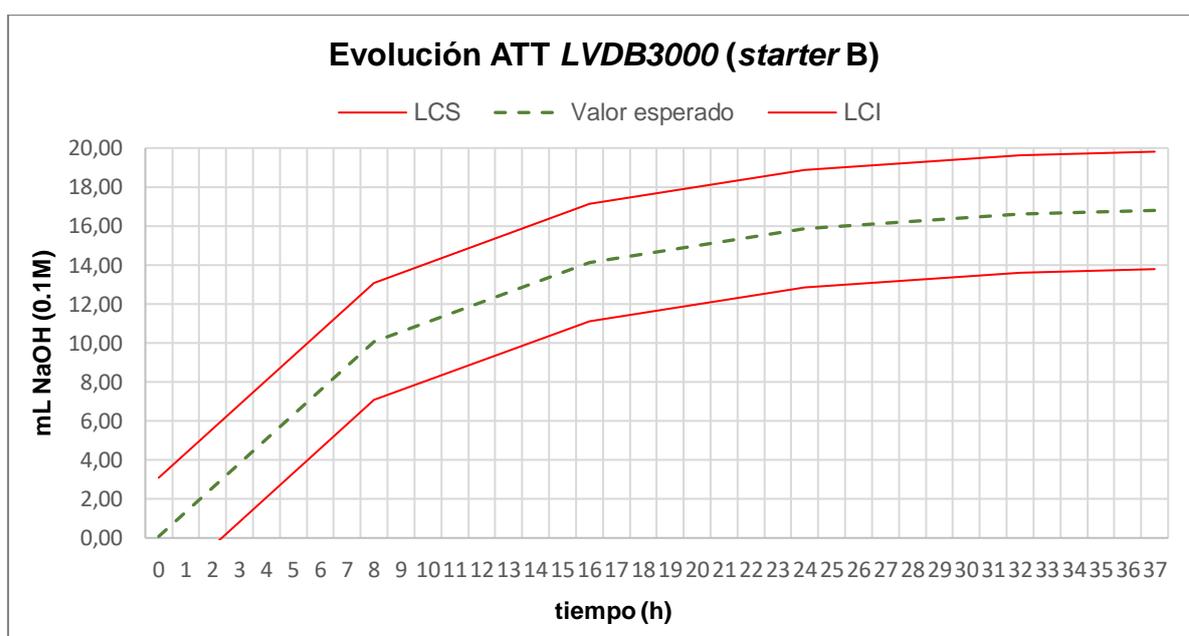


Figura A2.6. Gráfico de Shewart para el control de ATT a lo largo de un ciclo productivo de LVDB3000, (elaborada con starter del proveedor B). LCS, (Límite de Control Superior); LCI, (Límite de Control Inferior).

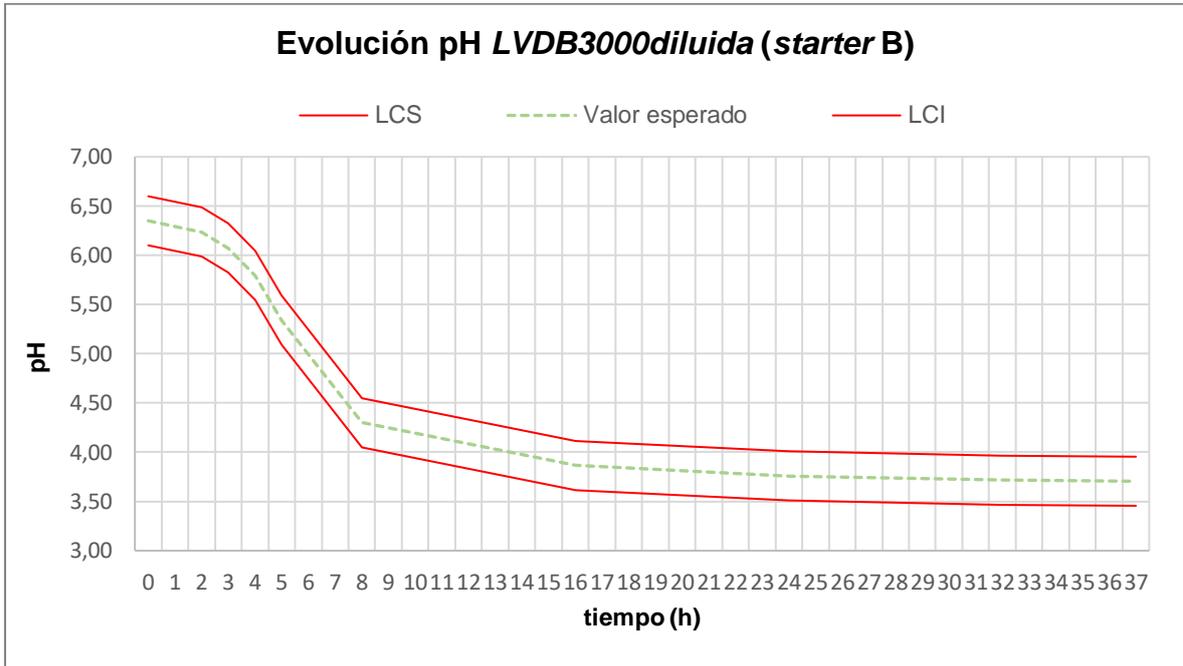


Figura A2.7. Gráfico de Shewart para el control de pH a lo largo de un ciclo productivo de LVDB3000diluida, (elaborada con starter del proveedor B). LCS, (Límite de Control Superior); LCI, (Límite de Control Inferior).

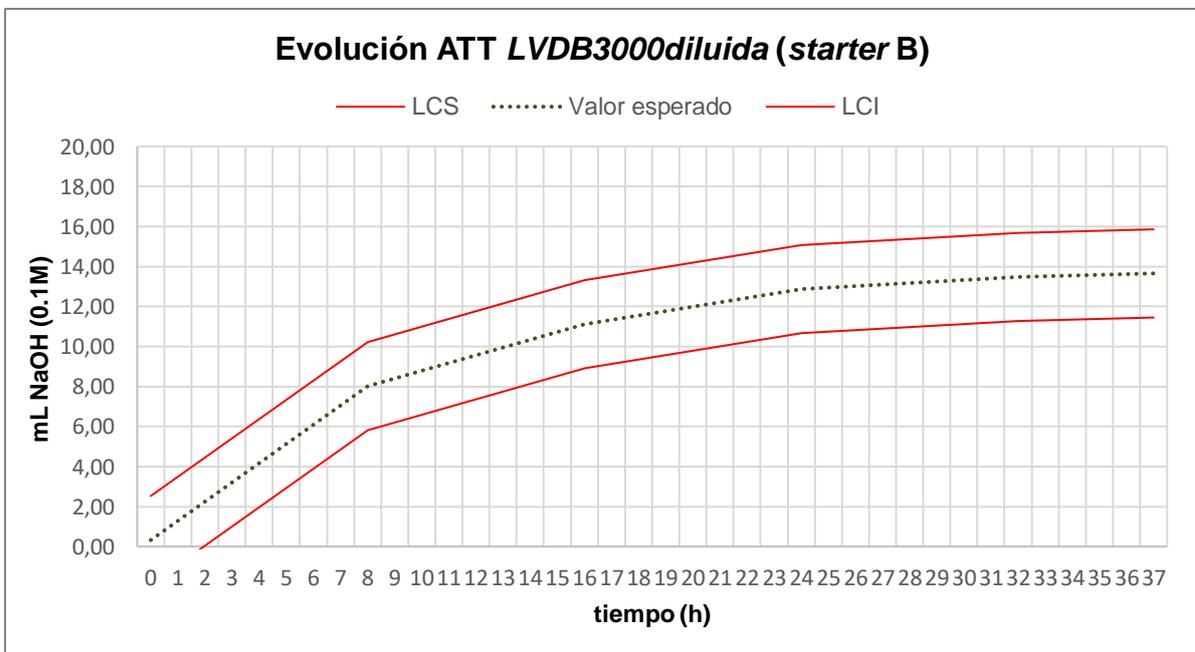


Figura A2.8. Gráfico de Shewart para el control de ATT a lo largo de un ciclo productivo de LVDB3000diluida, (elaborada con starter del proveedor B). LCS, (Límite de Control Superior); LCI, (Límite de Control Inferior).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo quiero dedicárselo especialmente a mis tutores del proyecto, Carlos Antonio Blanco Fuentes, por su interés y preocupación en todo momento, y a José María Giralda Sánchez, por su dedicación y disposición dentro de la empresa, ya que sin ellos no habría podido desarrollar hasta este punto mi TFM. Por otra parte, me gustaría dedicárselo a Jesús María Espeso, operario del taller de masas madre, con quién he pasado una parte importante de mi tiempo en la empresa, y quien me ha enseñado todo lo que estaba en su mano. Por último, quiero destacar el apoyo de mis padres, quienes me impulsaron a realizar la titulación del máster, y por lo que me siento orgullosa de haberla completado con éxito.