



MODIFICACIÓN DE LA RECETA DE MASA MADRE INDUSTRIAL PARA ADECUARSE A LA NORMATIVA VIGENTE

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2020/21

Alumno:

Margarita Barrios Amo

Tutores:

Carlos Blanco Fuentes (Universidad de Valladolid)

Vanesa de la Fuente (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

CONTENIDO

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. Masas madre.....	4
2.1.1. Clasificación de la masa madre	7
2.2. Bacterias ácido-lácticas	8
2.3. Levaduras.....	9
2.4. Legislación vigente aplicable al pan y a la masa madre	10
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIAL Y MÉTODOS	12
4.1. Materiales.....	12
4.2. Equipos.....	13
4.3. Proceso productivo de la nueva masa madre de trigo duro.....	14
4.3.1. Acondicionamiento del fermentador.....	14
4.3.2. Mezcla de los ingredientes y fermentación	15
4.4. Regulación pH.....	16
4.5. Control del proceso productivo	17
4.5.1. Medición del pH.....	18
4.5.2. Medición de la acidez total titulable (TTA)	18
4.6. Análisis estadístico.....	19
5. RESULTADOS.....	19
5.1. Regulación del pH.....	19
5.2. Resultados organolépticos con la nueva receta de masa madre.....	20
5.3. Resultados medidores de pH.....	21
5.4. Resultados de pH y TTA entre nueva receta y antigua receta.....	22
6. DISCUSIÓN	23
7. CONCLUSIONES	27
8. AGRADECIMIENTOS.....	28
9. BIBLIOGRAFÍA	29

1. RESUMEN

La masa madre es un fermento compuesto por harina y agua principalmente, que ha ganado popularidad en los últimos años debido a las características que aporta al pan; pero su uso no estaba regulado. Por ello, en 2019 entró en vigor en España el R.D 308/2019, de 26 de abril, por el que se aprueba la norma de calidad para el pan.

En este trabajo se modificó la receta de masa madre del *Grupo Lesaffre*, para adecuarla a la normativa vigente, midiendo la capacidad de acidificación de la combinación de *Lactobacillus brevis* y *Saccharomyces chevalieri*, y determinándose las condiciones y proporciones de sosa (NaOH) caustica al 25% que hay que añadir, para regular el pH.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran una masa madre con un olor característico a ácido acético que en la receta anterior no aparecía, pero se consigue reducir el pH de forma natural.

ABSTRACT

Sourdough, which has gained popularity in recent years due to the characteristics it brings to bread, is a ferment composed mainly of flour and water, but its use was not regulated. For this reason, in 2019, R.D 308/2019, of 26 April, on the quality of bread came into force in Spain

In this work, the *Lesaffre Group's* sourdough recipe was modified to comply with current regulations, measuring the acidification capacity of the combination of *Lactobacillus brevis* and *Saccharomyces chevalieri*, and the conditions and proportions of caustic soda (NaOH) to be added to regulate the pH were determined at the 25%.

The results obtained from this study show a sourdough with a characteristic smell of acetic acid that did not appear in the previous recipe, but it is possible to reduce the pH naturally.

2. INTRODUCCIÓN

El pan es uno de los alimentos más consumidos en el mundo. Aporta nutrientes necesarios como almidón, fibra dietética, lípidos, vitaminas y minerales. Por otro lado, la textura, el volumen, el color y el aroma determinan la calidad del pan (Cho y Peterson, 2010). Los productos de panadería, que son la principal fuente de carbohidratos de la dieta diaria, tienen índices glucémicos elevados, incluso si se producen a partir de cereales integrales (Demirkesen-Bicak *et al.*, 2021).

En los últimos años, la producción tradicional de pan de masa madre ha gozado de un éxito renovado con una demanda cada vez mayor por parte del consumidor de alimentos más naturales, sabrosos y saludables (Arendt *et al.*, 2007). El consumo de pan de masa madre se debe principalmente al sabor, que es sin duda el atributo más importante que determina el consumo de este tipo de pan (Pétel *et al.*, 2017).

2.1. Masas madre

La masa madre es un ecosistema complejo en el que las bacterias ácido lácticas (BAL), principalmente lactobacilos heterofermentativos, y la levadura interactúan conjuntamente y con los otros ingredientes en función de los parámetros del proceso (De Vuyst *et al.*, 2017, De Vuyst *et al.*, 2014). Las BAL son las responsables de la acidificación de la masa debido a producción de ácido láctico y ácido acético mientras que las levaduras son responsables de la acción leudante a través de la producción de dióxido de carbono (Figura 1) (Vogelmann *et al.*, 2009).

Además de la mezcla de harina y agua se pueden agregar algunos ingredientes adicionales para estimular la fermentación de la microflora, como azúcar o enzimas. Las harinas empleadas en las elaboraciones de pan con masa madre se ciñen casi exclusivamente a las de trigo y de centeno, individualmente o en combinación (Pétel *et al.*, 2017). Los componentes de estas harinas son los que van a determinar la calidad del proceso de elaboración en los cambios físicos y químicos de la masa (Antoja Giralt, 2015). Por tanto, dependiendo de la proporción de los ingredientes que se añadan y de los parámetros del proceso del pan (fermentación y horneado), el pan de masa madre se caracterizará por tener un perfil volátil específico (Pétel *et al.*, 2017) y un sabor ligeramente ácido (Oshiro *et al.*, 2020).



Figura 1. Productos generados por la acción de la fermentación de levaduras y bacterias lácticas en masas madre. (Adaptada de Antoja Giralt, 2015).

Este producto se ha utilizado desde la antigüedad para mejorar la calidad y aumentar la vida útil del pan (Arendt *et al.*, 2007). Además, también ayuda a mejorar las propiedades nutricionales y organolépticas, aumentar el contenido de compuestos bioactivos (Pétel *et al.*, 2017), compuestos antimicrobianos en condiciones ácidas (De Vuyst *et al.*, 2017) y se puede utilizar como agente antifúngico natural en los productos de pan, ya que numerosos mohos como *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* son propensos a aparecer (Galoburda, 2020; Jin *et al.*, 2021). Pero sus funciones principales son leudar la masa para producir una pieza más gaseosa, y como tal conseguir un pan más aireado (Arendt *et al.*, 2007), además de proporcionar un aroma mejorado a los panes de trigo y centeno (Pétel *et al.*, 2017).

A pesar de su larga tradición y los efectos positivos que tiene sobre el pan, aún no se han entendido completamente varios detalles sobre la tecnología de la masa madre. Los mecanismos que operan en la masa madre y su aplicación son complejos y numerosos (Figura 2). Dentro de los mecanismos se encuentran una gran variedad de características de la harina y parámetros de proceso que contribuyen a ejercer efectos muy particulares sobre la actividad metabólica de la microflora de la masa madre. También, durante la fermentación, se producen cambios bioquímicos en los componentes de carbohidratos y proteínas de la harina debido a la acción de enzimas microbianas. La velocidad y el alcance de estos cambios influyen en gran medida en las propiedades de la masa madre y en la calidad del producto horneado final (Gänzle y Ripari, 2016).

Se han propuesto varias hipótesis que pueden ayudar a explicar los efectos de la masa madre sobre la masa y la calidad del pan. Por ejemplo, los relacionados con el impacto directo del pH en la estructura de la masa, los correspondientes al efecto del ácido sobre las enzimas de los cereales y los que están relacionados con el efecto de los microorganismos por sí solos (Gänzle y Ripari, 2016).

Lo que sí se sabe es que la combinación de la actividad enzimática de la microbiota de la masa madre junto con la actividad enzimática de los sustratos de cereales determina la calidad del producto (Gänzle, 2014). Debido a esto, lograr una calidad constante del producto requiere el control de la composición y actividad fermentativa. Por tanto, el uso de masa madre en la producción de pan precisa del conocimiento de la ecología microbiana de la masa madre y su influencia en la calidad del pan (Gänzle y Ripari, 2016).

Por ello, la producción de masa madre por parte de los proveedores de la industria de la panificación, en este caso el *Grupo Lesaffre*, se realiza en condiciones controladas y, a menudo, implica el uso de cultivos iniciadores definidos.

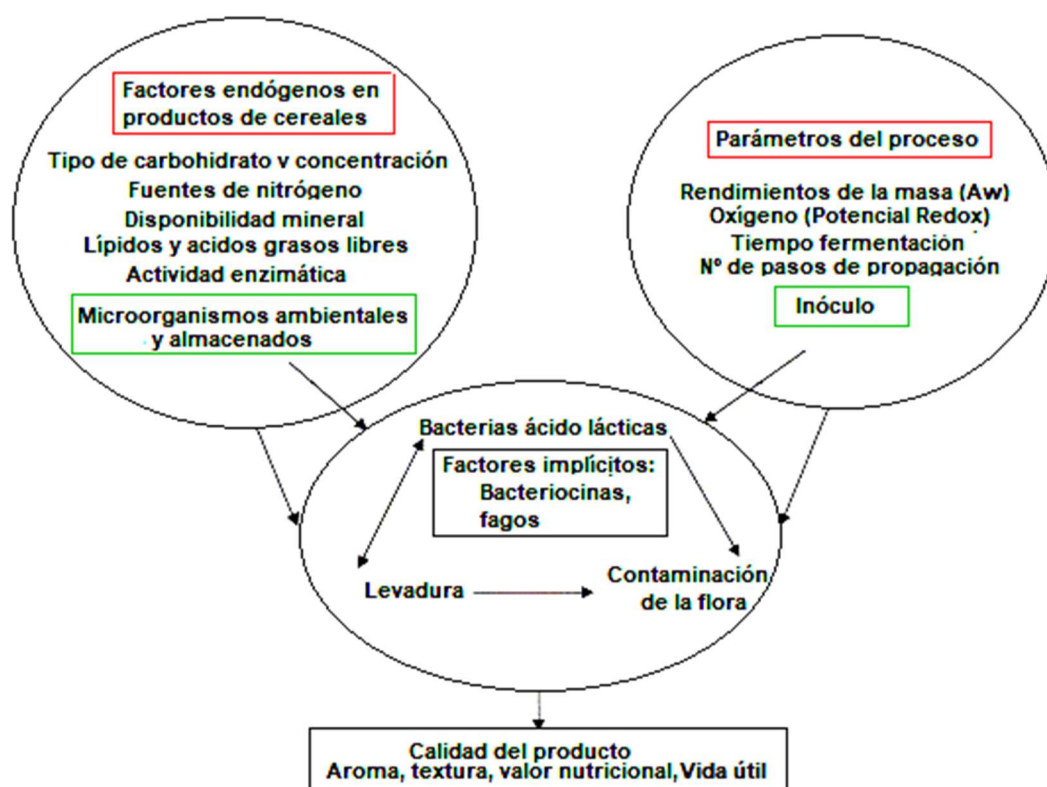


Figura 2. Factores endógenos y parámetros del proceso que afectan el crecimiento y las condiciones metabólicas de la microbiota de la masa madre y la calidad del pan de masa madre (Adaptada de Gänzle y Ripari, 2016).

2.1.1. Clasificación de la masa madre

La masa madre se puede clasificar de diversas formas, uno de los tipos es en función de cómo se ha formado la masa madre si de manera espontánea o inoculada. La **masa madre espontánea**, es aquella donde la fermentación se produce debido a la microflora de la harina silvestre; mientras que la **masa madre inoculada** es una mezcla de iniciadores seleccionados que se añaden a la masa de pan (De Vuyst y Neysens, 2005). También se puede clasificar en cuatro tipos la masa madre en función del proceso de fermentación y la base de sus inóculos.

- **Masa madre tipo I:** se elabora con técnicas tradicionales y se denomina como *backslopping*, que consiste en refrescos diarios continuos para mantener los microorganismos en un estado activo, es decir, produciendo gases. Este proceso se realiza a temperatura ambiente (20-30 °C) y el pH es de aproximadamente 4,0 (De Vuyst y Neysens, 2005).
- **Masa madre tipo II:** surgen de la industrialización del proceso de horneado del pan y sirven para acidificar las masas. En este proceso se utilizan *starters*, siendo la duración del mismo de 2 a 5 días y se lleva a cabo a una temperatura de fermentación superior a 30 °C. Estas masas madre presentan un pH inferior a 3,5 después de 24 horas. Además, se pueden almacenar frescas hasta su uso (durante una semana), se pueden producir en grandes cantidades (Müller *et al.*, 2001) y se comercializan como productos semilíquidos (Gaggiano *et al.*, 2007).
- **Masa madre tipo III:** son masas madre mixtas, que se inician con un cultivo iniciador de BAL, para producir sabores específicos, y se realiza el *backslopping* tradicional (De Vuyst *et al.*, 2014). Son masas secas en forma de polvo, lo que aumenta su vida útil y facilita su uso. Se emplean principalmente como suplementos acidificantes y portadores de aroma durante la panificación (De Vuyst y Neysens, 2005).
- **Masa madre tipo IV:** es un tipo de masa madre característica de estudios de laboratorio o de algunas panaderías artesanales (Siragusa *et al.*, 2009). En este caso, la masa madre es iniciada con un cultivo iniciador, que puede ser una cepa comercial solo de levadura o solo de BAL o mezcla; este cultivo se propaga con *backslopping* (Siepmann *et al.*, 2018).

Por último, también se pueden clasificar en masas **madre vivas** e **inactivas** según el Real Decreto 308/2019, de 26 de abril. La **masa madre viva** contiene una microflora acidificante constituida esencialmente por bacterias lácticas y levaduras salvajes. Asimismo, puede deshidratarse si tras su hidratación contiene una flora viva de bacterias lácticas y levaduras que asegure la fermentación de la masa de pan.

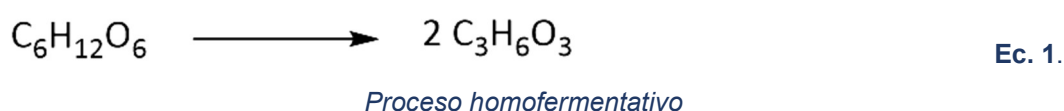
Por otro lado, en la **masa madre inactiva** los microorganismos se encuentran en estado fisiológicamente inactivo por haber sido sometida la masa a un tratamiento de secado, pasteurización o equivalente, pero que conserva propiedades organolépticas que mejoran la calidad de los productos finales.

2.2. Bacterias ácido-lácticas

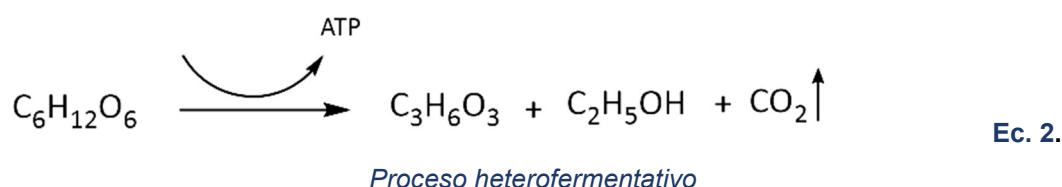
Las BAL son lo más característico de las masas madre. Son bacterias anaerobio-facultativas, de pared Gram-positiva que, para su crecimiento, requieren nutrientes como aminoácidos, vitaminas del grupo B y carbohidratos fermentables, para dar lugar a diversos subproductos como lactato, acetato, etanol, dióxido de carbono, formiato o succinato (Parra Huertas, 2010).

Según la fermentación de la lactosa, las BAL se clasifican en homofermentativas (producen solo ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otras sustancias) (Parra Huertas, 2010).

- Las bacterias homofermentativas (Ec. 1) utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas para convertir la glucosa en ácido láctico.



- Por otro lado, las heterofermentativas (Ec. 2) producen a partir de glucosa, ácido láctico, ácido acético y/o etanol y CO_2 .



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 (Antoja Giralt, 2015).

Las principales especies de BAL que se encuentran en las masas madre son *Lactobacillaceae* (*Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus paralimentarius*) y *Leuconostocaceae*, pero también enterococos y estreptococos (Gänzle y Ripari, 2016, De Vuyst *et al.*, 2014).

Sin embargo, no se puede establecer una microbiota concreta a la masa madre, ya que esto depende de los procedimientos de muestreo, aislamiento e identificación. Además, una serie de factores intrínsecos y extrínsecos pueden influir en la composición de la microbiota de la masa madre. Por ejemplo, influyen la harina (tipo, calidad, etc.) y los parámetros del proceso (temperatura, pH, rendimiento de la masa, prácticas de *backslopping*, etc.). Por lo tanto, la presencia de una bacteria u otra, depende de factores ambientales y tecnológicos, aunque actualmente se pueden seleccionar BAL en función de su capacidad para acidificar rápidamente la mezcla de harina y agua y/o por su capacidad para producir sabores específicos (De Vuyst *et al.*, 2014).

Las BAL, además de acidificar el medio al producir ácido láctico o/y ácido acético, también presentan otras ventajas como la generación de sustancias antimicrobianas, como ácidos, bacteriocinas, compuestos antifúngicos (ácidos grasos), acetoina, reuterin y diacetilo, y ayudando a fortalecer el sabor, textura y valor nutricional de los alimentos (Jin *et al.*, 2021). También se las considera organismos probióticos, al ser capaces de incrementar los niveles de compuestos bioactivos (antioxidantes, anticancerígenos o péptidos antiinflamatorios) (Park *et al.*, 2019).

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 por el R.D. 308/2019, de 26 de abril. 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 (Martorana *et al.*, 2018).

2.3. Levaduras

Además de BAL, la microbiota de la masa madre contiene levaduras ascomicetas, debido a su capacidad fermentativa (De Vuyst *et al.*, 2014). La estabilidad de las masas

madre depende de la cooperación específica entre determinadas especies de levaduras y BAL (Vrancken *et al.*, 2020).

En la revisión que hacen De Vuyst *et al.*, (2014) se revelan las seis especies de levadura que se encuentran a menudo en la masa madre: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania exigua*, *Candida humilis*, *Pichia kudriavzevii*, *Torulaspora delbrueckii* y *Wickerhamomyces anomalus*. Sin embargo, se puede dar más variabilidad en el número y tipo de especies ya que depende de varios factores, como el grado de hidratación de la masa, el tipo de cereal utilizado, la temperatura de la levadura y la temperatura de mantenimiento de la masa madre (De Vuyst y Neysens, 2005).

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. Sin embargo, este tipo de levaduras, denominadas “levaduras salvajes”, no tienen la misma funcionalidad en las masas panificables que las levaduras cultivadas industrialmente (Antoja Giralt, 2015).

Las levaduras para producir gases en las masas panificables, tienen que transformar los azúcares simples intrínsecos del medio. Sin embargo, la harina contiene gránulos de almidón, formados por las macromoléculas amilosa y amilopectina constituidas a su vez por largas cadenas de moléculas de glucosa. Tras la molienda, estos gránulos se dañan y el almidón se vuelve más accesible físicamente, pero las largas cadenas siguen permaneciendo químicamente inutilizables para la levadura hasta que se encuentren en fragmentos más pequeños. Este trabajo lo realizan las enzimas amilasas, que rompen los enlaces entre los monómeros para liberar azúcares más pequeños y fermentables (glucosa o fructosa) (Lee, 2011). Las levaduras transforman los azúcares sencillos en CO₂ y alcohol, durante la fermentación alcohólica de la masa (Antoja Giralt, 2015; Yang *et al.*, 2020).

2.4. Legislación vigente aplicable al pan y a la masa madre

La legislación del pan se ha regulado recientemente con el Real Decreto 308/2019, de 26 abril, incluyendo todos los tipos de panes e incorpora también el concepto de masa madre. Esta nueva norma de calidad ha derogado la anterior normativa (Real Decreto 1137/1984, de 28 de marzo), que ha estado vigente durante más de 35 años en España, e incorpora numerosas novedades de calidad.

El nuevo Real Decreto define en su artículo 8 la masa madre como “la masa activa compuesta por harina de trigo u otro cereal, mezclas de ellas, y de agua, con o sin adición de sal, sometida a una fermentación espontánea acidificante cuya función es asegurar la fermentación de la masa de pan”.

Este nuevo Real Decreto defiende que por el simple hecho de que un pan lleve masa madre, no garantiza que se pueda denominar “elaborado con masa madre”. Para poder utilizar dicha mención, estos panes deben tener una proporción de masa madre igual o superior al 5 % del peso total de la harina de la masa y sin la adición de aditivos que bajen el pH. Por otro lado, la cantidad de levadura añadida debe de ser menor de 0,2%, pero no se especifica si puede ser fresca o en polvo.

También se contempla que la masa madre debe tener un pH inferior a 4,2 y una acidez total titulable (TTA) superior a 6, expresada como los mililitros de NaOH 0,1 M necesarios para llevar a pH 8,5, diez gramos de masa madre. La TTA es un análisis que cuantifica el nivel de ácidos totales presentes en la disolución.

Asimismo, la masa de pan, antes de su cocción y una vez terminada, deberá tener un pH inferior a 4,8. Este valor de pH será producido únicamente por la acción biológica acidificante de la microflora que esté presente en la masa madre.

Por otro lado, en el artículo 12 del Real Decreto, se permite el uso de enzimas, ya que son utilizadas como coadyuvantes en la panificación, esto quiere decir que realizan su acción y después ya no se encuentran en el producto final y no tienen acción sobre este.

3. OBJETIVOS

Desde hace poco más de dos años, el *Grupo Lesaffre* ha conseguido producir industrialmente masas madre. Sin embargo, tras la publicación del Real Decreto 308/2019, de 26 de abril, la empresa se ha visto afectada de cara a la venta del producto. Por ello, el objetivo general de este trabajo fue adaptar la receta de masa madre para adecuarse a la nueva norma y poder seguir vendiendo el producto como masa madre.

Para lograr tal fin, los objetivos específicos planteados en el desarrollo de este estudio fueron los siguientes:

- Estudiar posibles diferencias significativas entre las medidas de la sonda de pH situada en el tanque de fermentación y el pH-metro del laboratorio.

- Determinar las proporciones de sosa (NaOH) al 25% que hay que añadir a la masa madre y las condiciones en las que debe adicionarse al tanque de fermentación dicha disolución.
- Estudiar las diferencias significativas que pueden existir respecto al pH y la TTA entre la antigua receta y la nueva receta.
- Determinar las características finales de la masa madre tras la modificación de la receta y compararlas con la receta anterior.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Materiales

Para la formación de la masa madre con la nueva regulación pH se utilizaron los siguientes materiales: harina de trigo duro, enzima amilasa, hidróxido sódico (NaOH) al 25%, cloruro sódico (NaCl), goma xantana y agua de proceso. También se añadieron los siguientes microorganismos: *Lactobacillus brevis* y *Saccharomyces chevalieri*. Por acuerdos de confidencialidad con la empresa, se omiten las proporciones en las que los ingredientes son aportados.

Las diferencias existentes entre la masa madre de la antigua receta y la nueva receta son la utilización de *Lactobacillus plantarum* y *Saccharomyces cerevisiae* como *starters*, el tipo de harina y la adición de acetato de sodio, cloruro de potasio y extracto de levadura en polvo. En la antigua receta no era necesaria la adición de sosa al 25% para regular el pH durante la elaboración de la masa madre ni tampoco el uso de amilasa.

Lactobacillus brevis es una BAL heterofermentativa y se ha seleccionado para este proyecto porque produce la suficiente cantidad de ácido acético, sin la necesidad de añadir acetato de sodio que generaría ácido acético.

Saccharomyces chevalieri es una levadura muy utilizada en panadería, debido a que en masa panificables permite fermentar los azúcares produciendo anhídrido carbónico y alcohol (Paramithiotis *et al.*, 2006).

La **enzima amilasa** se encarga de degradar los hidratos de carbono que se encuentran en la harina y convertirlos en azúcares simples y liberarlos al medio para que las bacterias puedan utilizarlos durante la fermentación y así, acelerar el proceso de formación de masa madre.

La **harina de trigo duro** es una harina especial que presenta en su composición un alto contenido en cenizas. Estas cenizas son consumidas por las BAL y la levadura para formar mayor cantidad de ácidos y CO₂.

La **sosa (NaOH)** al 25%, es una disolución que se puede utilizar en la industria alimentaria como regulador de pH o estabilizante sintético, ayudando a regular la acidez producida por las BAL.

El **NaCl**, además de ser un potenciador del sabor, también es un estabilizante sintético.

La **goma xantana** es un hidrocoloide con propiedades espesantes, que se utiliza en la elaboración de masa madre para evitar que decante la mezcla.

4.2. Equipos

La instalación (Figura 3) destinada a la producción de masa madre es una planta construida recientemente en *Lesaffre*. Esta planta se organiza en tres zonas, la de elaboración de masa madre, la de almacén de materias primas y envases y la de analíticas.

La zona de elaboración de masa madre tiene varios fermentadores que tienen en su interior un agitador y en la parte externa un encamisado de refrigeración y calentamiento; un depósito de limpieza CIP con regulador de temperatura, una bomba mezcladora, un sistema de válvulas que controlan el paso de solución por una u otra línea en base a las necesidades requeridas. También recientemente han incorporado a la zona un equipo donde se colocan *Big bag* de harina, para que la adición de ésta se haga de una forma más automática; y dos tolvas de diferentes diámetros de dosificación para las materias primas. En esta misma zona se encuentra la instalación destinada al llenado de garrafas y también la instalación de llenado de sobres.

Las garrafas de masa madre que se fabrican están destinadas a las panaderías o a grandes empresas de productos panaderos. Por otro lado, los sobres de masa madre líquida, que se vende en los supermercados para uso doméstico.

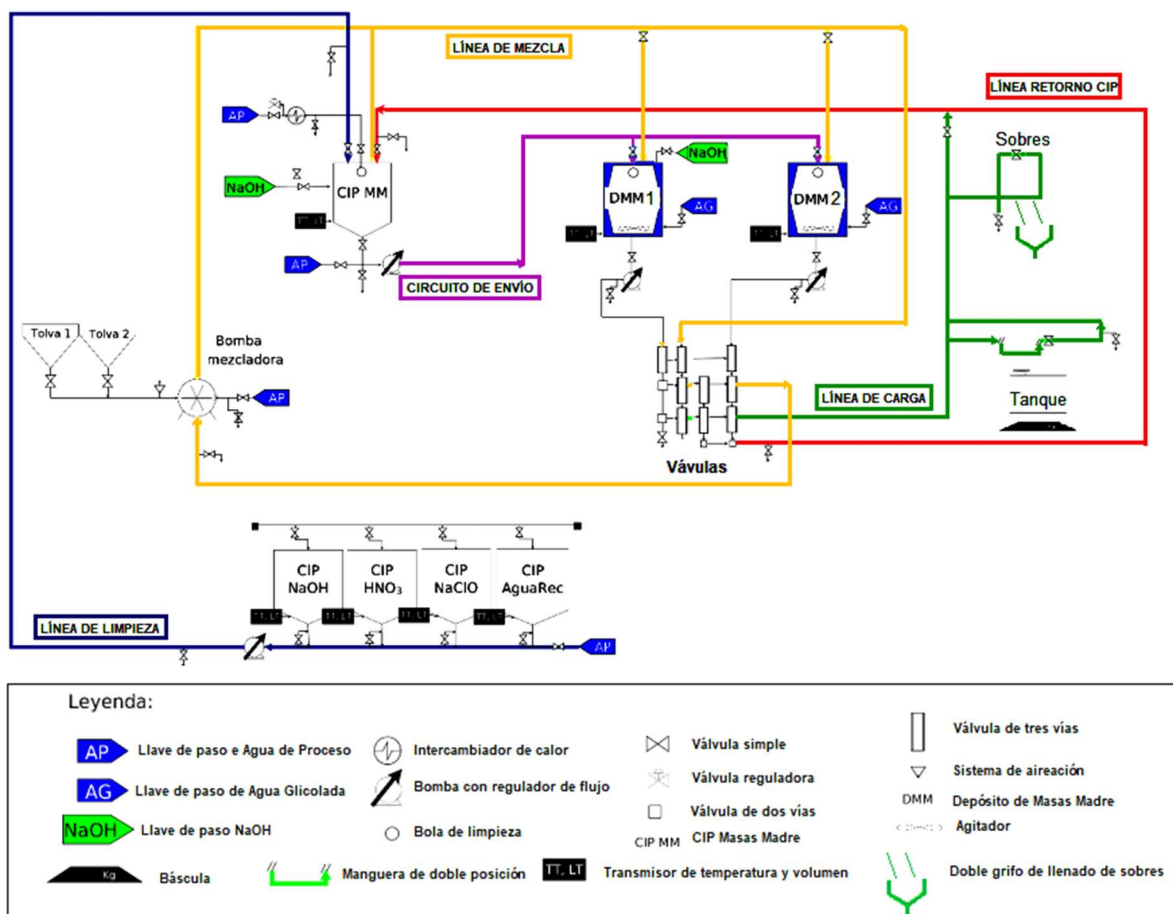


Figura 3. Esquema de la planta de masa madre. La línea azul representa la línea de limpieza que llena el tanque CIP; la línea roja representa el retorno del CIP una vez que ha limpiado los fermentadores; la línea morada representa el circuito de envío del CIP a los fermentadores y la línea amarilla es la línea de mezcla, por donde se introducen los ingredientes a través de las tolvas y la bomba mezcladora para ir a los fermentadores.

4.3. Proceso productivo de la nueva masa madre de trigo duro

Se trata de una masa madre líquida de tipo II, que se caracteriza por la presencia de *starters* del género *Lactobacillus brevis* y levaduras de la especie *Saccharomyces chevalieri*, en su formulación.

El proceso productivo de elaboración de la masa madre es semiautomatizado, utilizando un *software* para accionar algunos procesos.

4.3.1. Acondicionamiento del fermentador

El proceso se inicia llenando el fermentador con agua a 30 °C, porque a esta temperatura se potencia la acción acidificante de las BAL (De Vuyst *et al.*, 2014). Para ello, se abre la llave de paso de agua de proceso que conecta con un intercambiador de calor, al que previamente se le ha fijado la temperatura deseada.

Una vez que alcanza la temperatura y el volumen del líquido deseado en el interior del tanque, se toma una muestra del agua para analizar que el cloro dosificado esté entre los niveles de 1,0 y 1,5 ppm, lo que permitirá mantener el control microbiano. En este momento, el fermentador se encuentra preparado para añadir las materias primas gradualmente.

4.3.2. Mezcla de los ingredientes y fermentación

Tras acondicionar el fermentador con agua de proceso, se introduce un 1 % de la cantidad total de harina de trigo duro por la tolva 1, porque el agua, que está dentro del fermentador, contiene cloro que puede afectar al resto de los ingredientes. Seguidamente se incorpora la enzima amilasa.

La premezcla se mantiene en recirculación por las tuberías durante 15 minutos, con la finalidad de consumir el cloro residual y arrastrar al fermentador los ingredientes que han podido quedarse en las tuberías. Esta recirculación se mantiene gracias al sistema de válvulas y bombas; sobre todo a la bomba mezcladora que permite, debido a la agitación, velocidad y presión adecuadas, la integración de los ingredientes a la mezcla. A continuación, se incorpora a la mezcla la bacteria (*Lactobacillus brevis*) y se homogeneiza durante 10 minutos.

Seguidamente, se introduce en el fermentador el resto de la harina, se homogeneiza y se mide el pH de la mezcla. En este punto concluye el aporte de ingredientes necesario para la formación de la masa, marcando el inicio de la fermentación, denominado “tiempo 0”. Cada hora se irán tomando medidas de pH hasta que llegue a un valor de pH de 5,89. En este punto, se estabilizará el pH entre 5,89 y 5,90 durante 7,5 horas añadiendo sosa (NaOH) al 25% para neutralizar el ácido acético que producen las BAL. Este ácido ayuda a bajar el pH de forma natural en la masa madre. Durante este periodo de tiempo se controlará el pH y la TTA.

Terminado el tiempo de estabilización del pH y sin adicionar más sosa (NaOH), la masa madre sigue fermentando y reduciendo el pH. Cuando el pH sea inferior a 5 se añade la levadura. A partir de este punto, sigue la fermentación que tendrá una duración entre 36 - 40 horas y se anotará el pH y la TTA cada 4 horas.

Para introducir la enzima, la bacteria y la levadura se disuelven en un recipiente con 1 litro de la mezcla recogida del fermentador a través de un grifo de muestras.

Seguidamente, se añade dicha mezcla al fermentador por la compuerta superior del tanque de fermentación.

La adición de dicha levadura ayuda a conseguir un mayor desarrollo organoléptico a la masa madre. Se añade a un pH inferior a 5, que es un 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 principio de la fermentación, se debe a la competencia microbiana que surgiría entre las BAL y la levadura por los azúcares procedentes de la harina. La levadura consumiría estos azúcares y, como consecuencia, la producción de ácidos se vería reducida.

La actividad de la levadura también puede verse afectada por la presencia de sales en el medio, por ello, se añade NaCl al final de la fermentación y se disuelve la mezcla por recirculación durante 15 minutos.

Durante la fermentación, la mezcla se mantendrá en agitación (20 rpm) para evitar su decantación y también, se irán produciendo diversos ácidos que disminuirán el pH del medio.

Una vez terminado el proceso fermentativo y con el fin de evitar la decantación de la mezcla durante el acondicionamiento del producto, se adiciona goma xantana, que absorberá el exceso de agua provocando un aumento de la viscosidad (en torno a 3500 – 4500 mPa·s) de la masa. Este espesante se añade mediante el sistema de recirculación durante 15 minutos y a 1200 rpm.

Una vez formada la masa madre, se acondiciona a una temperatura entre 2 y 6 °C, teniendo de esta manera unas condiciones próximas a las de almacenamiento.

Terminado este tiempo, se detiene la recirculación y con ayuda de agua de proceso se recupera el producto que haya podido quedar retenido en las tuberías del circuito, drenando el exceso por las válvulas de purga.

4.4. Regulación pH

Para la regulación pH se optó por dos opciones. La primera opción era hacer una instalación de un pequeño depósito de sosa (NaOH), que estuviera conectado al fermentador de masa madre por una tubería que tuviera una bomba peristáltica para adicionar la sosa (NaOH). La segunda opción, era directamente desde el depósito principal de almacenamiento de sosa (NaOH) y mediante una tubería, adicionar sosa

(NaOH) por un picaje en la parte superior del tanque de fermentación y controlada por un caudalímetro (Figura 4).

Finalmente se decidió probar la segunda opción, ya que reducía los costes y se podría empezar antes a probar la nueva formulación de la masa madre.



Figura 4. Opciones que se plantearon para realizar la regulación pH de la nueva receta de masa madre. En la figura, la línea azul representa la primera opción de tomar directamente sosa (NaOH) del depósito externo y adicionarlo con un picaje en la zona superior del fermentador, controlado con un caudalímetro. Por otro lado, la línea roja representa la segunda opción de instalar un depósito nodriza, que ira adicionando sosa (NaOH) al fermentador a través de una bomba peristáltica.

Para la nueva formulación de masa madre se incorporó también una sonda de pH en el tanque de fermentación (Figura 5) que fue calibrado previamente. Esta sonda de pH tiene el objetivo de facilitar el control del pH de la masa madre a través de los monitores sin la necesidad de desplazarse a la sala de masa madre y controlar la adición de sosa (NaOH) al 25% en las condiciones óptimas.



Figura 5. Fotografía de la sonda de pH que han instalado en Lesaffre en la zona de masa madre.

4.5. 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 con el pH o la TTA. La medida de pH

normalmente se realiza cada hora desde el tiempo 0, hasta que se adiciona la levadura (pH inferior de 5) y hasta completar el proceso fermentativo.

En la receta anterior también se hacía el seguimiento del proceso de elaboración con el índice de acidez.

4.5.1. Medición del pH

La medición del pH en la masa madre se llevó a cabo mediante el método que se describe a continuación.

- **Preparación de la muestra**

La muestra se recoge del fermentador donde se está elaborando la masa madre a través de una llave. Se recoge una cantidad de aproximadamente 200 ml en un vaso de precipitados.

Una vez recogida la muestra, hay que lavar la llave de paso con agua y posteriormente añadir Alcodes, una solución de 2-propanol, para descontaminar la llave, ya que la masa madre es un producto vivo y puede contaminar. Esta solución se deja actuar durante 30 minutos para poder coger la siguiente muestra.

- **Medición del pH**

Para medir el pH se utilizó un pH-metro SesiON + PH3. También se controló mediante una sonda de pH integrada marca Endress Hauser en el depósito de fermentación. Esta sonda de pH se introdujo en el tanque de fermentación, se calibró y empezó a medir el pH en continuo durante todo el proceso de fermentación de masa madre.

4.5.2. Medición de la acidez total titulable (TTA)

La TTA cuantifica el nivel de ácidos totales presentes en la disolución, expresado como los ml de NaOH 0,1 N necesarios para llevar a pH 8,5, diez gramos de masa madre, según el Real Decreto 308/2019, de 26 de abril. La medición de la TTA en la masa madre se llevó a cabo mediante el método que se describe a continuación.

- **Preparación de la muestra y la solución de valoración**

Se preparó una disolución 1:10 en un vaso de precipitados. Seguidamente se disolvió con un agitador magnético durante 2 minutos. A continuación, se preparó una solución NaOH 0,1 N para realizar la valoración.

▪ **Medición de la TTA**

La muestra mezclada se valoró usando una bureta con NaOH 0,1 N mientras se iba midiendo el pH hasta un valor de 8,5. Los ml de NaOH 0,1N gastados corresponden al valor de la TTA de la muestra.

4.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa SPSS v.24 (SPSS, Chicago, IL, USA). Las variables estudiadas fueron analizadas mediante la prueba t de Student para comprobar si existían diferencias significativas entre un tratamiento y otro para el pH, y entre los valores de pH y TTA de la nueva receta y la antigua receta.

5. RESULTADOS

La masa madre aún es un producto en desarrollo en la empresa y más aún con el cambio de la normativa. Debido a esto, el proceso productivo sigue siendo semiautomatizado y es necesario que un operario, a través de un programa informático, ponga en marcha el sistema de válvulas, bombas y fermentadores.

5.1. Regulación del pH

Para regulación del pH se hicieron varias pruebas hasta obtener la proporción adecuada de sosa (NaOH). Primeramente, a través del programa informático se fue abriendo y cerrando la válvula de sosa (NaOH) durante tiempos de 1, 2 y 4 segundos.

Con 1 segundo la cantidad de sosa (NaOH) era muy pequeña y la fermentación de masa madre se alargaría en el tiempo, mientras que con 4 segundos de apertura se adicionaba demasiada cantidad de una vez en el fermentador. Finalmente se optó por mantener abierta la válvula 2 segundos.

La válvula que se utilizó se programó para que adicionara sosa (NaOH) a razón de 270 cm³/s durante 2 segundos y se hicieron pruebas para saber cada cuánto tiempo debería adicionar sosa (NaOH) durante la regulación del pH. Primero, se fue añadiendo sosa (NaOH) cada 240 segundos, hasta llegar a un valor de pH entre 5,80 y 5,90. Cuando el pH bajase de 5,80 se abriría la válvula y añadiría sosa (NaOH).

Tras observar que la adición de sosa (NaOH) estaba siendo eficaz, se decidió cambiar el rango de pH de 5,85 a 5,90 para gastar menos cantidad de sosa (NaOH) para las próximas regulaciones y que la válvula fuera añadiendo cada 720 segundos.

Finalmente, tras comprobar que la válvula que adiciona la sosa (NaOH) estaba siendo muy eficaz, se decidió ajustar aún más el rango de pH dejándolo entre 5,89 y 5,90 con un tiempo de adición de 240 segundos. Este rango de pH permite reducir el gasto de sosa (NaOH) y, por lo tanto, supone un ahorro considerable para la empresa a lo largo del tiempo. Además, dejar el pH en esos valores hace que las BAL formen más cantidad de ácido acético.

Otro de los problemas que se plantearon es que no se sabía con exactitud el volumen de sosa (NaOH) que se estaba adicionando, ya que el caudalímetro está en una línea con sobrepresión y, en ocasiones, esa presión hace que este cuente un pulso, aunque no esté dosificando la válvula sosa (NaOH) en el fermentador. Debido a esto, no se tuvo en cuenta la lectura del caudalímetro.

Para contabilizar el volumen de sosa (NaOH) que se estaba añadiendo al fermentador, mediante el programa informático al que va asociado la válvula, se hizo una prueba en la que se adicionaron 8 litros de sosa (NaOH) a un recipiente graduado a través de la válvula. Seguidamente, se midió el volumen que había en el recipiente y se obtuvo una medida de 8,5 litros; es decir, la válvula adiciona 0,5 litros más de los que debería para este volumen. Usando esta proporción, el departamento de mantenimiento solventó el problema modificando los ml de sosa (NaOH) a añadir en la apertura de la válvula, para conseguir dosificar el volumen de sosa (NaOH) deseado.

5.2. Resultados organolépticos con la nueva receta de masa madre

Al añadir la sosa (NaOH) al tanque de fermentación se observó la formación de coágulos, espuma, olor desagradable y aumento de la temperatura de hasta 33 °C (Figura 6). Debido a esto, se redujo la cantidad de sosa (NaOH) a 220 cm³/s y se modificó el tiempo que permanecía cerrada tras la adición, dejándola en 480 segundos.

Con la reducción de la cantidad de sosa (NaOH) que se añadió durante la elaboración de masa madre no se obtuvo mejor resultado que con la prueba anterior, pero tras pasar la masa madre por la bomba mezcladora los grumos y la espuma desaparecieron en ambas masas madres.

Tras envasar la masa madre, se observó que presentaban un olor más ácido y más cantidad de burbujas que la masa madre habitual, pero no presentaba el olor desagradable que se produce durante la elaboración. También se observó que a la hora de hacer análisis no se disolvía con facilidad en el agua.



Figura 6. Detalle del aspecto grumoso generado durante la elaboración de la nueva receta de masa madre tras la adición de sosa (NaOH) al 25%.

5.3. Resultados medidores de pH

Se realizaron dos pruebas de la nueva receta en distintas semanas y se comparó si el pH-metro del laboratorio y la sonda de pH del tanque estaban midiendo igual.

Inicialmente los resultados mostraban diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos con el pH-metro del laboratorio y la sonda de pH del tanque, se comprobaron todos los resultados y se llegó a la conclusión de que había datos erróneos debido a que la sonda de pH del tanque no estaba bien calibrada. Tras solventar el problema, se analizaron los valores no encontrando diferencias significativas ($p < 0,05$). Seguidamente, se procedió a hacer la media de los valores de cada pH que se muestran en la Figura 7.

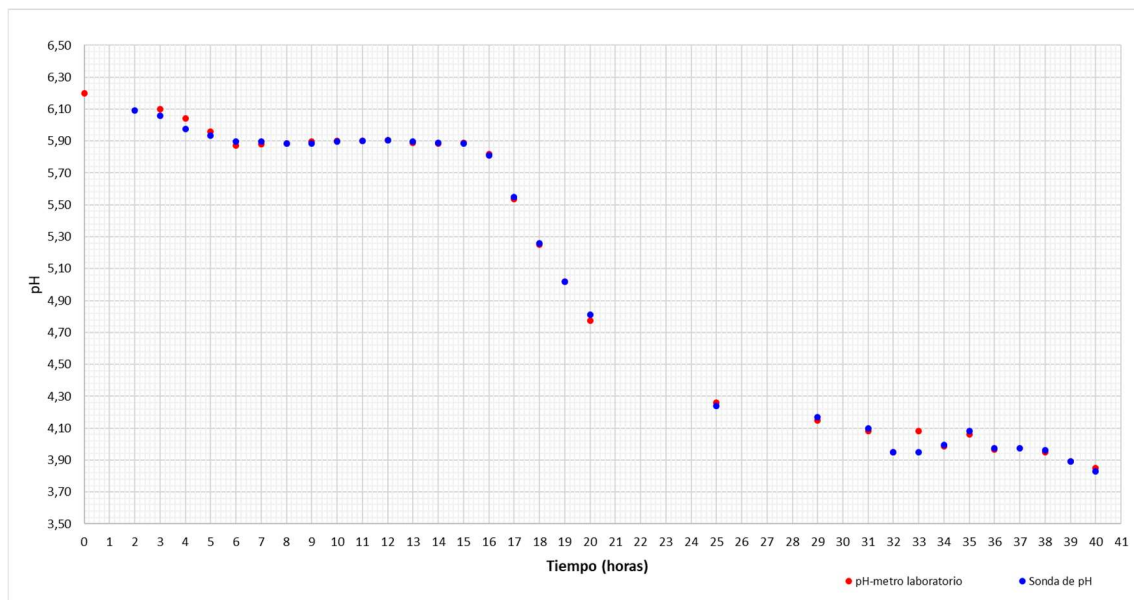


Figura 7. Comparación de los resultados del pH-metro del laboratorio y entre la sonda de pH del tanque. Los resultados que se muestran son la media de los valores obtenidos en el pH-metro del laboratorio y la sonda de pH del tanque, representados en valores de pH frente a tiempo en horas.

5.4. Resultados de pH y TTA entre nueva receta y antigua receta

Tras no haber obtenido diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el pH-metro del laboratorio y la sonda de pH del tanque, se decidió hacer la media de los valores de pH y compararlos con los valores de la antigua receta, que se habían tomado con el pH-metro del laboratorio. En la Figura 8, se muestran las diferencias del pH entre la nueva receta y la antigua receta de masa madre.

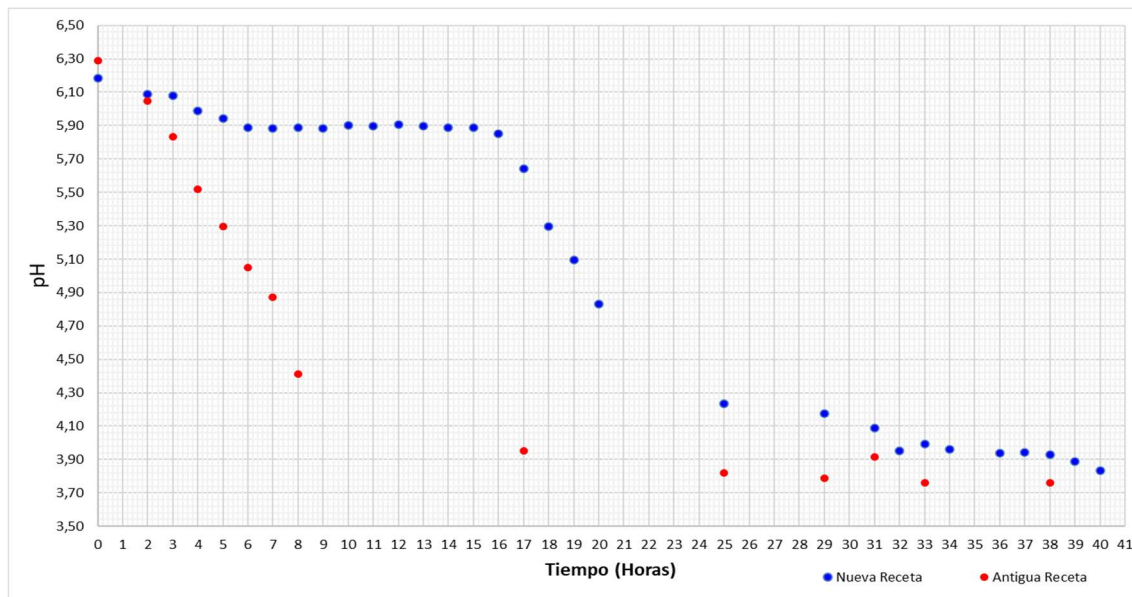


Figura 8. Comparación de la curva de pH entre la nueva receta y la antigua receta de masa madre. Los resultados que se muestran son las medias de los valores obtenidos en la nueva receta y la antigua receta, representados en valores de pH frente a tiempo en horas.

Tras comparar los resultados, se observó que había diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la nueva receta y la antigua receta de la masa madre, que se puede visualizar en la Figura 8.

En la figura 9 se presentan los valores de TTA durante el proceso de producción de masa madre tanto en la nueva como en la antigua receta y al comparar dichos resultados, se observó que había diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores de TTA obtenidos.

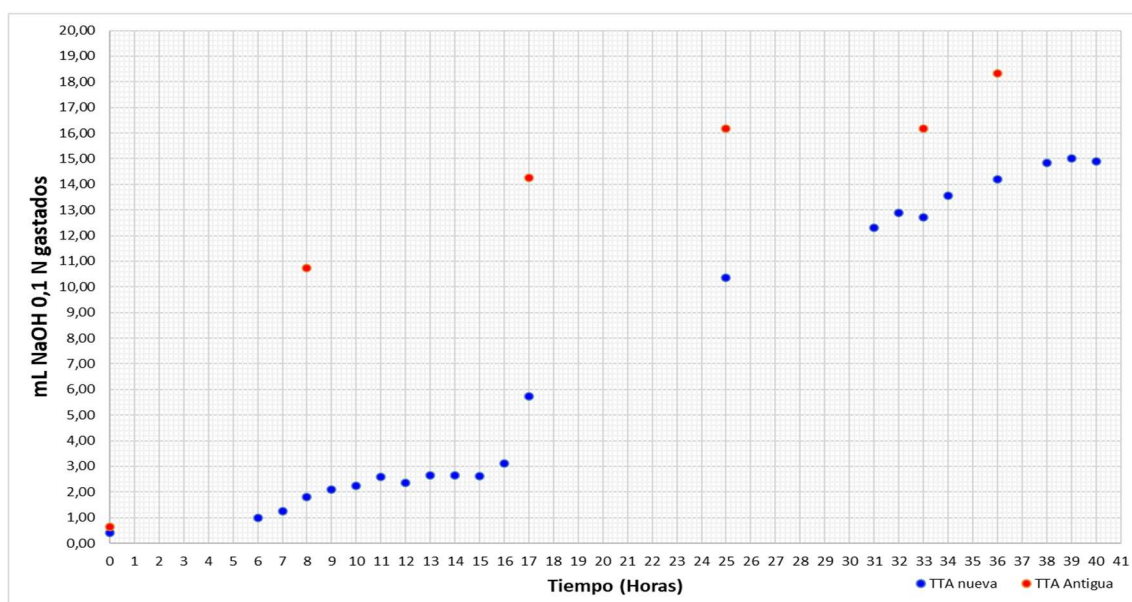


Figura 9. Comparación de los valores de la TTA de la nueva y antigua receta de masa madre. Los resultados que se muestran en el gráfico son las medias de los resultados, representados en mL de NaOH 0,1 gastados frente a tiempo en horas.

Como se puede observar en la Figura 8, el uso de aditivos que reducen el pH en la antigua receta ayudan a obtener un valor medio de pH de 3,76. Con la nueva receta, sin aditivos y con el cambio de ingredientes, se consigue un valor medio de pH de 3,92. Por otro lado, en la Figura 9 también se observa que con la antigua receta se conseguía un valor de TTA (18,32) mucho más alto que con la nueva receta (14,91).

Por otro lado, también se observa que para obtener dichos valores de pH y TTA con la nueva receta de masa madre es necesario una fermentación de 40 horas, mientras que en la antigua receta se obtenían dichos valores en 36 horas. También se puede observar que los valores de pH y de la TTA de la masa madre de la antigua receta no se estabilizan al final de la fermentación, mientras que en la nueva receta sí sucede.

Además, en esta nueva receta es necesario mantener el pH entre 5,89 y 5,90, para obtener al final un valor de pH más bajo mientras que en la antigua receta no es necesario realizar este proceso.

6. DISCUSIÓN

L. brevis es una BAL heterofermentativa que produce más cantidad de ácido acético que la *L. plantarum*. Este resultado se debe al hecho de que *L. plantarum* es una bacteria homofermentativa o facultativamente heterofermentativa; además, *L. brevis* produce más cantidad de ácido acético (CH_3COOH) cuando se combina con la levadura *S. chevalieri* (Tabla 1) (Meignen *et al.*, 2001). Aunque la formación de ácidos depende de

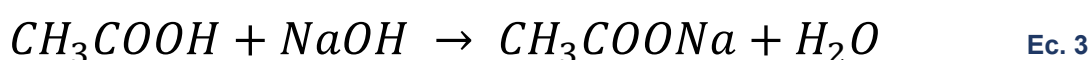
la cepa y de otros factores como la temperatura, el tiempo de fermentación, el rendimiento de la masa y el contenido de cenizas de la harina (Novotni *et al.*, 2011). El uso de la levadura *S. chevalieri* también se debe a que *L. brevis* inhibe el crecimiento de *S. cerevisiae* (Meignen *et al.*, 2001).

A pesar de que la combinación de *L. brevis* y *S. chevalieri* produzca bastante cantidad de ácido acético (CH₃COOH), no es suficiente para tener un pH de 4 o inferior y una TTA alta. Por ello, es necesario estabilizar el pH entre 5,89 y 5,90 durante la fermentación, ya que a este pH es cuando la bacteria *L. brevis* por si sola produce más cantidad de ácido acético (CH₃COOH) según la investigación que se ha realizado en el Grupo Lesaffre.

Tabla 1. Contenido de ácido láctico y ácido acético en la masa madre al final de la fermentación con diferentes starters (Adaptada de Novotni *et al.*, 2011).

Starter	Microorganismos	Ácido Láctico (g/100g)	Ácido Acético (g/100g)
Cultivo puro	<i>L. plantarum</i>	0,96 ± 0,06	0,01 ± 0,01
LV4	<i>L. brevis</i> + <i>S. chevalieri</i>	0,67 ± 0,06	0,19 ± 0,04

La estabilización del pH se realiza adicionando sosa (NaOH) al 25% a la masa madre. La sosa (NaOH) neutraliza el ácido acético (CH₃COOH) produciendo agua y acetato sódico (CH₃COONa) como se puede ver en la Ec. 3. La neutralización oculta la cantidad real de ácido acético que han producido las BAL, por ello en la Figura 9 no se ve un aumento de la TTA entre la hora 9 y la hora 15, pero si se ve un aumento muy rápido cuando se ha dejado de adicionar sosa (NaOH) a la hora 17.



Neutralización del ácido acético.

Sin embargo, la adición de sosa (NaOH) no solo neutraliza el ácido acético (CH₃COOH), sino que también produce desnaturalización del gluten. El gluten es una proteína que se encuentra en los cereales y sus harinas. La masa madre está formada por harina y agua principalmente, la cual, tras pasar por las tuberías y la bomba, además del continuo mezclado que sufre en el tanque de fermentación favorece la formación de la red de gluten.

Esta red de gluten se ve afectada al adicionar sosa (NaOH), porque este compuesto al entrar en contacto con la masa madre, forma por un lado sales de sodio y agua (Batey y Gras, 2007), pero también algunos de los iones sodio disueltos en el medio se unen a

los puentes disulfuro (S-S) que forman las proteínas. El azufre se une a los iones de sodio formando sales y libera hidrogeno que formará agua o si se une a otros azufres producirá ácido sulfhídrico (H₂S) (Salazar Cedillo y Núñez Altamirano, 2013).

La formación de estos compuestos influye en la masa madre ya que se forman grumos, espuma y un olor característico a huevos podridos. Los grumos y la espuma se deben a la rotura de los puentes disulfuro durante la desnaturalización de las proteínas de gluten. Además, estas características se ven favorecidas por el cambio químico del medio, efectos mecánicos como la agitación que hay en el tanque de fermentación y cambios en el pH (Badui Dergal, 2013).

En la masa madre se forman compuestos orgánicos, como los ácidos orgánicos producidos por el BAL y compuestos volátiles, como alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y compuestos sulfurados (Siepmann *et al.*, 2018). Sin embargo, el olor característico a huevos podridos es producido por el ácido sulfhídrico (H₂S), este ácido solo se nota cuando hay grandes cantidades de producto, por eso solo se notó su presencia al abrir la compuerta superior del tanque y no en las muestras.

Aunque estas características no estén en el producto final, si se obtuvo una masa madre con más cantidad de burbujas de aire, que se producen durante la fermentación de la masa madre, pero que quedan atrapadas debido al uso de goma xantana. Esta característica se consiguió eliminar adicionando en caliente la goma xantana y seguidamente enfriando el producto con agitación ligera en el tanque de fermentación. Estas condiciones ayudan a que las burbujas de aire que se forman se puedan liberar fácilmente al exterior y no queden atrapadas en la masa madre.

Respecto a los resultados obtenidos al comparar la antigua receta y la nueva receta de masa madre, se ve claramente que son diferentes, ya que, aunque la forma de elaborar la masa madre sea bastante parecida, se han utilizado distintos ingredientes como dos nuevos *starters* (*L. brevis* y *S. chevalieri*), harina de trigo duro con un contenido superior en cenizas, enzima amilasa y la incorporación de sosa (NaOH) al 25% para regular el pH. Aunque la combinación de estos ingredientes haga que se obtenga una masa madre con un aroma mucho más ácido respecto a la receta anterior, que tenía un aroma característico a harina; se debe principalmente al tipo de BAL utilizadas. En general, las BAL heterofermentativas producen principalmente acetato de etilo, alcoholes y aldehídos, mientras que las BAL homofermentativas producen diacetilo y otros carbonilos (De Vuyst y Neysens, 2005).

Otro de los cambios que se hicieron, fue la incorporación de una sonda de pH en el tanque de fermentación. Tras los resultados, se comprobó que la sonda de pH y el pH-metro del laboratorio estaban dando valores idénticos; y por ello, facilitará el control de pH de la masa madre desde el monitor sin la necesidad de desplazarse hasta la sala de masa madre; y, además permitirá que la adición de sosa (NaOH) se realice en el rango de pH deseado.

Por último, uno de los puntos importantes de este trabajo es el cambio de normativa en el pan, que ha hecho que sea necesario modificar la receta de masa madre. Antiguamente, la receta de masa madre del *Grupo Lesaffre* estaba basada en el Reglamento 1333/2008, ya que en el Real Decreto 1137/1984, de 28 de marzo, no estaba regulada la masa madre.

En este nuevo Real Decreto se especifica que no se pueden utilizar aditivos para reducir el pH, pero no especifica que no se puedan utilizar otro tipo de sustancias, como la sosa (NaOH) o la goma xantana. Por el contrario, en el Reglamento 1333/2008 si permite el uso de la sosa (NaOH) para ajustar el pH, sin una dosis máxima establecida, y goma xantana como estabilizante, con una dosis máxima de 20000 mg/kg, en productos a base de cereales. Además, este reglamento, también permite el uso de aditivos para reducir el pH en productos a base de cereales, por ello se utilizaban en la receta anterior.

Además, la sosa (NaOH) no hace falta incluirla en la lista de ingredientes al actuar como un coadyuvante según el Reglamento 1169/2011, de 25 de octubre, sobre etiquetado, mientras que la goma xantana si es necesario incluirla. Por último, como en el caso de la sosa (NaOH), no hace falta incluir las enzimas en la lista de ingredientes.

7. CONCLUSIONES

- Tras los resultados obtenidos se ha comprobado que la sonda de pH del tanque proporciona valores iguales a los del pH-metro del laboratorio, por lo que facilitará el control de la producción de masa madre mediante los monitores sin necesidad de desplazarse a la sala de masa madre y, además, permitirá que la regulación de pH con la adición de sosa (NaOH) al 25%, se realice en el rango de pH correspondiente.
- Con esta modificación de la receta se consigue obtener la primera masa madre, que se fabrica a nivel industrial en España, que cumple con la normativa vigente sobre el pan R.D. 308/2019, del 26 de abril.
- Gracias a que se ha conseguido modificar la receta de masa madre, las empresas que utilicen este producto del *Grupo Lesaffre*, pueden poner en la etiqueta de sus productos que están elaborado con masa madre.
- *Lactobacillus brevis* en combinación con *Saccharomyces chevalieri* es capaz de producir una cantidad considerable de ácido acético, sin la necesidad de añadir aditivos que reduzcan el pH de la masa madre como se realizaba en la receta anterior. Por otro lado, se consigue una TTA ligeramente más baja que en la receta anterior.
- Las instalaciones que se han utilizado para la regulación pH permiten adicionar la sosa (NaOH) al 25% de forma eficaz sobre la mezcla, permiten saber qué volumen se está adicionando y cada cuánto se realiza. Además, han permitido un ahorro importante para la empresa, al no haber sido necesario la construcción de un bidón de sosa (NaOH) nodriza con el correspondiente coste.
- La adición de sosa (NaOH) al 25% permite regular el pH, pero genera olor a ácido sulfhídrico (H₂S), grumos y espuma durante la elaboración de masa madre, que después desaparecen en el producto final, únicamente quedando un olor característico al ácido acético (CH₃COOH) que en la receta anterior no aparecía.

8. AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de una forma u otra, han hecho posible la realización de este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer la dedicación a mis tutores, el Dr. Carlos Antonio Blanco Fuentes y a Vanesa de la Fuente García, por darme la posibilidad y ayudarme a realizar este proyecto.

En especial a Vanesa de la Fuente García, por el trato recibido desde el primer día y por enseñarme el proceso de producción de la masa madre. A los operarios Sergio, Quique, Iván y Jesús, por estar dispuestos siempre a explicarme las cosas. También quiero agradecer al resto del personal de la empresa por acogerme.

A todos los profesores que han impartido clases durante el máster, por su dedicación y enseñanzas aportadas.

A mis mejores amigos, Félix y Raquel, por seguir acompañándome después de la carrera; y a mis nuevas amigas del máster, por hacerme los días más divertidos.

A Iván, mi pareja, quien siempre ha estado ahí cuando lo he necesitado, animándome, apoyándome y confiando en mí.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, por su confianza y apoyo constante, no solo en la realización de este trabajo, sino en todas las etapas de mi vida. Y en especial, mi más sincero agradecimiento, a mis padres, ya que, sin su esfuerzo y cariño, no hubiera podido hacer este máster y conocer a tantas personas maravillosas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Antoja Giralt, F. J. (2015). *Masas madre elaboración y utilización*. Barcelona: Montagud Editores.
- Badui Dergal, S. (2013). *Química de los alimentos*. México: Pearson Educación.
- Batey, I., & Gras, P. (2007). Solubilization of wheat gluten with sodium hydroxide. *International Journal of Food Science & Technology*, 16(5), 561-566. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb01852>.
- De Vuyst, L., & Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1), 43-56. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.012>.
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H., & Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? *Food Microbiology*, 37, 11-29. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.002>.
- Demirkesen-Bicak, H. A. (2021). Effect of Different Fermentation Condition on Estimated Glycemic Index, In Vitro Starch Digestibility, and Textural and Sensory Properties of Sourdough Bread. *Foods*, 10(3), 1-13. <https://doi.org/10.3390/foods10030514>.
- Gaggiano, M. D. (2007). Defined multi-species semi-liquid ready-to-use sourdough starter. *Food Microbiology*, 24(1), 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.04.003>.
- Galoburda, R. S. (2020). Dynamics of Volatile Compounds in Triticale Bread with Sourdough: From Flour to Bread. *Foods*, 12(9), 1-17. <https://doi.org/10.3390/foods9121837>.
- Gänzle, M. G. (2014). Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 37, 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.007>.
- Gänzle, M. R. (2016). Composition and function of sourdough microbiota: From ecological theory to bread quality. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 239, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.004>.
- Jin, J. H., Thanh, H. N., Humayun, S., Park, S., Oh, H., Lim, S., Kim, D., Kunal, P & Yan, Li., (2021). Characteristics of sourdough bread fermented with *Pediococcus pentosaceus* and *Saccharomyces cerevisiae* and its bio-preservative effect against *Aspergillus flavus*. *Food Chemistry*, 345, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128787>.
- Lee, J. A. (2011). Yeast Are People Too: Sourdough fermentation from the microbe's point of view. *Cured, Smoked, and Fermented: Proceedings of the Oxford Symposium on Food and Cooking*, 385, 175-188.
- Martorana, A., Giuffré, 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. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3100-x>.
- Meignen, B. O., Gélinas, P., Infantes, M., Guilois, S., & Cahagnier, B. (2001). Optimization of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast. *Food Microbiology*, 18(3), 239-245. <https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0395>.
- Meignen, B., Onno, B., Gélinas, P. I., Guilois, S., & Cahagnier, B. (2001). Optimization of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast. *Food Microbiology*, 18(3), 239-245. <https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0395>.
- Müller, M. R., Wolrum, G., Stolz, P., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2001). Monitoring the growth of *Lactobacillus* species during a rye flour fermentation. *Food Microbiology*, 18(2), 217-227. <https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0394>.

- Novotni, D., Curic, D., Martina, B., Colic Bari, I., Skevin, D. S., & Cukelj, N. (2011). Glycemic index and phenolics of partially-baked frozen with sourdough. *Faculty of Food Technology and Biotechnology*, 62(1), 26-33. <https://doi.org/10.3109/09637486.2010.506432>.
- Oshiro, M., Tanaka, M., & Zendo, T. N. (2020). Impact of pH on succession of sourdough lactic acid bacteria. *Bioscience of Microbiota*, 39(3), 152-159. <https://doi.org/10.12938/bmfh.2019-038>.
- Paramithiotis, S., Gioulatos, S., Tsakalidou, E., & Kalantzopoulos, G. (2006). Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochemistry*, 41(12), 2429-2433. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.07.001>.
- Park, D., Bae, J., Kim, M., Kim, H., Kang, S., Shim, S., Han, N. (2019). Suitability of *Lactobacillus plantarum* SPC-SNU 72-2 as a Probiotic Starter for Sourdough Fermentation. *Journal of microbiology and biotechnology*, 29(11), 1729-1738. <https://doi.org/10.4014/jmb.1907.07039>.
- Parra Huertas, R. R. (2010). Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93 - 105.
- Pétel, C. O. (2017). Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review. *Trends in Food Science and Tecnology*, 59, 105-123. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.015>.
- Salazar Cedillo, M. V., & Núñez Altamirano, W. R. (2013). Determinación del método para la obtención de queratinacósmética a partir de plumas gallináceas. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/1088>.
- Siepmann, F. B., Ripri, V., Waszczynskyj, N., Spier, & R., M. (2018). Overview of Sourdough Technology: from Production to Marketing. *Food Bioprocess Technol*, 11(2), 242-270. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1968-2>
- Siragusa, S., Di Cagno, R., Ercolini, D., Minervini, F., Gobbeti, M., & De Angelis, M. (2009). Taxonomic Structure and Monitoring of the Dominant Population of Lactic Acid Bacteria during Wheat Flour Sourdough Type I Propagation Using *Lactobacillus sanfranciscensis* Starters. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1-29. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1968-2>.
- Vogelmann, S. A., Seitter, M., Singer, U., Brandt, M. J., & Hertel, C. (2009). Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. *International Journal of Food Microbiology*, 130(3), 205-212.
- Vrancken, G., De Vuyst, L., Van der Meulen, R., Huys, G., Vandamme, P., & Daniel, H. (2020). Yeast species composition differs between artisan bakery and spontaneous laboratory sourdoughs. *FEMS Yeast research*, 10(4), 471-481. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00621.x>.
- 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), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109195>