

EVOLUCIÓN EN COMPOSICIÓN QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE MASAS MADRE DE PANETTONE

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Máster en Ingeniería Alimentaria aplicada a la Salud

María Prieto Flores



EVOLUCIÓN EN COMPOSICIÓN QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE MASAS MADRE DE PANETTONE

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Máster en Ingeniería Alimentaria aplicada a la Salud

María Prieto Flores

Curso Académico 2023/2024

Tutores:

Begoña Benito Casado

Miguel Angel Castro García

Agradecimientos

En primer lugar, quería agradecer a Begoña Benito Casado y María Antonia Bañuelos Bernabé por darme la oportunidad de realizar este trabajo y por su dedicación en el, ya que sin su guía y colaboración no habría sido posible. Así mismo, agradecer a Miguel Castro y la empresa Marea Bread por confiar en mí y por su implicación en el proyecto.

Mis agradecimientos a Blanca García de Blás por su ayuda en el laboratorio, por resolver todo tipo de dudas y preguntas triviales durante meses y por compartir su sabiduría y organización, las cuales me han servido tanto a nivel profesional como personal. De la misma forma, agradecer a Marisa López y Rosa Isabel Prieto por su acogida, paciencia y amabilidad.

También quería agradecer a mis padres, por su apoyo económico y emocional, y, junto a ellos, al resto de familiares por sus ánimos y confianza en mí.

Por último, quería darles las gracias a mis compañeros de clase que se han convertido en grandes amigos. Ha sido un placer compartir y cerrar esta etapa con vosotros.

Índice de contenidos

1. Resumen	5
2. Abstract	6
3. Listado de abreviaturas	7
4. Introducción	8
5. Marco teórico	9
5.1. El panettone	9
5.2. La masa madre de panettone	10
5.3. Elaboración de masa madre	11
5.3.1. Los ciclos de refresco	12
5.3.2. Etapas de refresco	12
5.3.3. Refrescos cortos antes de la producción	13
5.3.4. Refrescos largos, fase “de limpieza” o “de conservación”	14
5.3.5. Amasado	15
5.4. Microorganismos presentes en masas madre de panettone	16
6. Materiales y métodos	18
6.1. Recuento microbiológico y aislamiento de levaduras y bacterias de masa madre	18
6.2. Medios de cultivo utilizados en este trabajo.....	20
6.2.1. Medios para el aislamiento de levaduras.....	20
6.2.2. Medios utilizados para el aislamiento de bacterias acéticas.....	21
6.2.3. Medio utilizados para el aislamiento de bacterias lácticas.....	22
6.3. Prueba catalasa y tinción de Gram	24
6.4. Caracterización molecular de los microorganismos aislados por PCR	24
6.5. Microfermentación de bacterias aisladas en viales.....	26
6.6. Determinación de acidez total y determinación enzimática de ácido L-láctico, D-láctico y ácido acético	27
7. Resultados y discusión	27
7.1. Puesta a punto de los medios de cultivo para el aislamiento de levadura	27
7.2. Puesta a punto de los medios de cultivo para aislar y diferenciar bacterias acéticas y lácticas	29
7.3. Recuentos de levaduras y bacterias lácticas	31
7.4. Caracterización molecular de los microorganismos aislados de masas de panettone por PCR y secuenciación	34
7.4.1. Resultados de secuenciación de fragmentos de DNA genómico de las levaduras aisladas	34
7.4.2. Resultados de secuenciación de fragmentos de DNA genómico de bacterias lácticas aisladas	35
7.5. Estudio de la capacidad fermentativa de las bacterias aisladas	37
7.6. Determinación de acidez total y determinación enzimática de ácido L-láctico, D-láctico y ácido acético	39
8. Conclusiones	41
9. Referencias bibliográficas	42

1. Resumen

El panettone es uno de los dulces tradicionales más consumido durante las festividades navideñas. El uso de masa madre en su elaboración supone numerosos beneficios en el producto final, como la mejora del volumen, valor nutricional, sabor y aroma, además de prolongar la vida útil. El objetivo de este trabajo fue estudiar la evolución microbiológica de las tres masas desarrolladas durante la preparación de panettone en la empresa Marea Bread: masa madre, primer impasto y segundo impasto.

Para ello, se realizaron recuentos de levaduras y bacterias que permitieron conocer el progreso de las poblaciones microbiológicas y la sinergia establecida entre ellas. Además se aislaron diversas colonias que fueron caracterizadas molecularmente mediante PCR y secuenciación. Los resultados de las secuencias revelaron la predominancia de *Fructilactobacillus sanfranciscensis* en la masa madre inicial, especie que fue desapareciendo con la formación de las masas posteriores, dejando lugar al desarrollo de otras bacterias lácticas como *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus lactis*. Por otra parte, se confirmó la presencia de las levaduras *Kazaschtania humilis*, como especie mayoritaria, y *Saccharomyces cerevisiae* en las tres masas analizadas.

Adicionalmente, se estudió la fermentación llevada a cabo por las distintas bacterias lácticas aisladas mediante microfermentación en viales. La pérdida de CO₂ por parte de *F. sanfranciscensis* y *L. mesenteroides* indicaron una fermentación heteroláctica, mientras que *L. lactis*, al no perder gas, indicó una fermentación homoláctica. Así mismo, el uso de medios con distintos azúcares permitió conocer la utilización metabólica de los mismos.

Finalmente, se determinó la acidez total producida por las bacterias mencionadas mediante una titulación ácido-base y se analizó la producción de ácido acético, ácido D-láctico y ácido L-láctico a través del multianalizador enzimático.

2. Abstract

Panettone is one of the most traditional sweets consumed during the Christmas holidays. The use of sourdough in its preparation provides numerous benefits to the final product, such as improved volume, nutritional value, flavour, and aroma, as well as prolonged its shelf life. The aim of this study was to investigate the microbiological evolution of the three doughs developed during the preparation of panettone at the Marea Bread company: sourdough, first dough, and second dough.

To achieve this, yeast and bacterial counts were conducted to understand the progress of the microbiological populations and the synergy established between them. Additionally, some colonies were isolated and characterized molecularly by PCR and sequencing. Sequence results revealed the predominance of *Fructilactobacillus sanfranciscensis* in the first sourdough, specie that disappeared with the formation of subsequent doughs, allowing the development of other lactic acid bacteria such as *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactococcus lactis*. Furthermore, the presence of the yeasts *Kazachstania humilis*, as the major species, and *Saccharomyces cerevisiae* in the three doughs analyzed was confirmed.

Additionally, the fermentation carried out by the different isolated lactic acid bacteria was studied through microfermentation in vials. The loss of CO₂ by *F. sanfranciscensis* and *L. mesenteroides* indicated a heterolactic fermentation, while *L. lactis*, which did not lose gas, indicated homolactic fermentation. Moreover, the use of medium with different sugars allowed the determination of their metabolic utilization.

Finally, the total acidity produced by the mentioned bacteria was determined by acid-base titration, and the production of acetic acid, D-lactic acid, and L-lactic acid was analyzed through the enzymatic multi-analyser.

3. Listado de abreviaturas

ABM: Applied Biological Materials
AGC: Agar Glucosa Cloranfenicol
ARNr: Ácido Ribonucleico Ribosómico
BAL: bacterias ácido-lácticas
CO₂: Dióxido de carbono
CS1 y CS2: Secuencias Comunes (del inglés Common Sequences)
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
DO: Densidad Óptica
F. sanfranciscensis: *Fructilactobacillus sanfranciscensis*
g: gramos
GYC: Glucosa, Yeast extract y Carbonato de calcio
HCl: Ácido clorhídrico
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
ITS: Internal Transcribed Spacer
K. humilis: *Kazachstania humilis*
K₂HPO₄: fosfato de potasio dibásico
KH₂PO₄: fosfato de potasio monobásico
L: litros
L. lactis: *Lactococcus lactis*
L. mesenteroides: *Leuconostoc mesenteroides*
MgSO₄: Sulfato de magnesio
mL: mililitros
MLO: Medium *Leuconostoc oenos*
MnSO₄: Sulfato de manganeso
MRS: Man-Rogosa-Sharpe
NaCl: Cloruro de sodio
NaOH: hidróxido de sodio
NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)
NH₄Cl: Cloruro de Amonio
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).
rpm: revoluciones por minuto
Ruta 6-PG/PK: ruta las pentosas fosfato
Ruta EMP: ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas
S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*
SPE: sustancias poliméricas extracelulares
TTA: Acidez Total Titulable (Total Titratable Acidity)
(UFC/g): Unidades Formadoras de Colonias/gramos
UV: Ultravioleta
YPD: Yeast Peptone Glucose
μL: microlitros

4. Introducción

El panettone es un dulce tradicional italiano que se ha convertido en un símbolo de las festividades navideñas. En su elaboración puede emplearse masa madre, un fermento natural compuesto por harina y agua, colonizado por una comunidad compleja de levaduras y bacterias que interactúan para producir una fermentación espontánea [1]. Este proceso tiene gran importancia en la panadería artesanal, tanto que ha sido empleado durante siglos para elaborar panes y otros productos de calidad superior. En particular, en la elaboración del panettone, se utiliza masa madre con el fin de lograr una textura característica, con la miga esponjosa y una corteza ligeramente crujiente. Además, se consigue un sabor más complejo y profundo, con notas ácidas y afrutadas, que realzan los demás ingredientes [2].

La evolución microbiológica de la masa madre de panettone es un fenómeno complejo, influenciado por factores como la composición de la harina, las condiciones ambientales y los métodos de refresco utilizados [3]. Este trabajo ha sido realizado en colaboración con el obrador madrileño Marea Bread (<https://www.mareabread.com/>). En él se evaluará el desarrollo de las distintas poblaciones microbianas durante el proceso de elaboración de panettone. Este objetivo general se alcanza mediante los siguientes objetivos específicos:

- Análisis del recuento de viables de levaduras, bacterias acéticas y lácticas durante tres etapas del período de maduración de la masa madre empleada para elaborar panettones en la empresa Marea Bread.
- Identificación de géneros y/o especies de diversas colonias aisladas de las tres masas mediante secuenciación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR.
- Microfermentación en viales de las bacterias aisladas para evaluar el crecimiento microbiano y el tipo de proceso fermentativo con el que podrían contribuir en la masa madre.
- Análisis de la acidez total y la producción de ácido acético, ácido D-láctico y ácido L-láctico de dichas bacterias.

5. Marco teórico

5.1. El panettone

El panettone es un postre tradicional navideño de origen italiano cuyo origen es hasta hoy incierto debido a las numerosas leyendas transmitidas a lo largo del tiempo. La historia más popular se remonta al siglo XV, en la corte del duque de Milán, Ludovico Maria Sforza. Durante una fiesta de gala, el cocinero quemó accidentalmente el postre preparado y, para salvar esta situación, el ayudante de cocina, Toni, añadió a la masa quemada harina, huevos, mantequilla, uvas pasas y frutas confitadas. El resultado fue un éxito entre los invitados, y el "Pan de Toni" se convirtió en el desde entonces conocido panettone [4].

El creciente interés global por la gastronomía y la facilidad de transporte y distribución de alimentos han contribuido significativamente a la popularidad del panettone. Aunque el mayor consumo de panettone tiene lugar en su país originario, Italia, este producto se ha extendido globalmente, convirtiéndose en un dulce navideño popular en muchas otras partes del mundo, como Europa, Sudamérica y algunos países de Norteamérica y Asia [5]. Además, la innovación en sabores y presentaciones ha ayudado a que este tradicional dulce italiano se adapte a los gustos y preferencias locales de diferentes culturas [6].



Figura 1. Panettones elaborados en Marea Bread.

Este tipo de pan dulce se caracteriza por tener forma abovedada (Figura 1) y una combinación de ingredientes que le confieren una textura ligera y esponjosa, además de un característico sabor. Entre ellos se incluyen harina, azúcar, mantequilla, huevos, miel y sal. Adicionalmente debe emplearse un agente leudante, como levadura panadera o masa madre. El panettone clásico se caracteriza además por poseer más de un 20% de uvas pasas y frutas confitadas [7], aunque existen muchas variantes que pueden incluir chocolate, frutos

secos u otras frutas. A lo largo de los años, la receta original del panettone ha ido ganando versiones, ya sea por el perfeccionamiento de las técnicas de preparación o por la incorporación de nuevos ingredientes [8].

5.2. La masa madre de panettone

En la elaboración tradicional de masa madre se emplea una mezcla de harina y agua que se deja reposar a temperatura ambiente cubierta en un paño para permitir la entrada de aire [9]. Por lo general, esta debe ser alimentada diariamente durante 3-7 días, proceso en el cual se descarta la mitad de la mezcla y se añade nuevamente la cantidad añadida inicialmente de harina y agua [1,10]. Este procedimiento permite la proliferación de los microorganismos presentes en la harina y el ambiente, dando como resultado una masa madre burbujeante y activa, lista para ser empleada en la elaboración de diversos productos horneados.

Así pues, es denominada masa madre “natural” aquella en la que estas poblaciones no han sido introducidas voluntariamente y guiadamente por parte del panadero. Se trata de microorganismos que se han ido equilibrando mediante competición y colaboración, mostrando una gran estabilidad entre ellos, especialmente si las condiciones ecológicas ofrecidas son estables (temperatura, hidratación, pH y disponibilidad de alimento) [11]. Esta mezcla fermentada por cultivos microbianos mixtos naturales de la harina y agua se mantiene activa a lo largo del tiempo y es empleada habitualmente como inóculo para las masas consecutivas en la preparación de diversos productos horneados [12].

La microbiota autóctona de la masa madre proporciona una importante fuente de bacterias ácido-lácticas (BAL) y levaduras, provenientes de la harina, el entorno de la panadería o de la materia vegetal, como frutas, vinagre o mosto, que pueden añadirse a la mezcla inicial de agua y harina [13]. La tasa de hidratación de las masas permite el desarrollo de estos microorganismos, ya que se alimentan principalmente de azúcares simples (maltosa, glucosa, fructosa, etc.), presentes directamente en la harina. De forma indirecta, la hidrólisis del almidón por parte de las amilasas permite la formación de azúcares más simples y utilizables, que constituyen el punto de partida de la fermentación que tiene lugar en la masa madre. El ecosistema microbiano lleva a cabo diversas transformaciones de la masa madre: las levaduras tienen un papel principal en la fermentación y la producción de

compuestos volátiles, mientras que las BAL están principalmente implicadas en la acidificación de la masa [11].

El número y tipo de microorganismos presentes en la masa madre está influenciado por la capacidad de estos para coexistir y, en sinergia, determinar el desarrollo de la masa [14]. De la misma forma, esta coexistencia de levaduras y bacterias conlleva diversas ventajas, tanto por el desarrollo microbiano como por la producción de aromas y sabores. Además, la elaboración de productos con masa madre supone otros beneficios, entre los que se incluyen la reducción del índice glucémico y el incremento de la biodisponibilidad de minerales [15].

Por otra parte, la comunidad microbiana de la masa madre y la actividad metabólica de la misma, están influenciadas por diversos factores ecológicos y parámetros del proceso, como el rendimiento, el número de pasos de propagación, la temperatura y el tiempo de fermentación [1,4].

5.3. Elaboración de masa madre

En panadería, el término de refresco consiste en una etapa de aporte de alimento a la masa madre y, por tanto, una fase de desarrollo de las poblaciones que la componen. Durante este proceso el volumen de la masa aumenta, mientras que el pH disminuye [16].

La multiplicación de los microorganismos fermentadores por escisión o gemación, constituye una forma de rejuvenecimiento perpetuo. De esta forma, controlar las fases sucesivas de refrescos es esencial para mantener un balance óptimo y evitar así poblaciones envejecidas y poco activas. Al refrescar la masa madre tiene lugar una subida de pH, (ya que la acidez de la masa se diluye), sin embargo, conforme aumenta la actividad fermentativa al añadir el sustrato, la acidez vuelve a incrementarse. La utilización de harinas adecuadas y la aplicación de métodos de conservación correctos asegura la preservación de microorganismos y su funcionamiento de manera eficiente, produciendo una fermentación controlada y consistente [17].

De este modo, durante la propagación constante de la masa madre se establece una conexión microbiana duradera que puede persistir a lo largo de los años, a pesar de que el

proceso fermentativo en sí mismo ocurra bajo condiciones no estériles [18]. El conjunto de microorganismos son de gran importancia para la notable mejora de las características sensoriales de los productos finales, como el volumen del panettone, la textura y el sabor. Además, aumentan su valor nutricional (por ejemplo, mediante la hidrólisis del fitato) y prolongan la vida útil [19].

5.3.1. Los ciclos de refresco

Los ciclos de refresco permiten mantener viva y activa la masa madre, proporcionándole los nutrientes necesarios para continuar fermentando. Suelen realizarse varias veces durante el proceso de elaboración del panettone, pero generalmente tienen en común los siguientes puntos [17]:

1. Las masas madre se preparan siempre con harinas blancas de trigos de fuerza, con valores de índice de fuerza (W) comprendidos entre 350 y 400.
2. Las masas madre son siempre hipohidratadas, con un valor de hidratación comprendido entre el 45 y 50%.
3. Las proporciones de masa madre y harina en el refresco suelen ser normalmente de 1 a 1. Por ejemplo, 1 kg de masa madre, 1 kg de harina y de 450 a 500 g de agua.
4. Todos los refrescos se amasan de 5 a 7 minutos a velocidad baja en una amasadora o batidora con gancho, después la masa se lamina y se pliega hasta obtener una masa perfectamente lisa.

5.3.2. Etapas de refresco

La preparación de una masa madre es uno de los puntos más exigentes de la elaboración de bollería. De forma general, requiere como mínimo 10 horas, aunque lo más frecuente es de 48 a 72 horas de fermentación a lo largo de numerosos refrescos, lo que asegura tener éxito en la masa final [17].

A pesar de que los procesos de amasado y las proporciones de masa madre, harina y agua son casi idénticos, existen dos tipos de refrescos que preceden a la fase de trabajo: el refresco largo y el corto.

En términos generales, durante la realización del refresco largo la masa debe almacenarse a una temperatura aproximada de 18°C durante 12 a 16 horas. Este refresco se guarda cubierto en una tela, también puede envolverse adicionalmente en un film plástico, con el fin de mantener completamente un ambiente de anaerobiosis. La falta de oxígeno dificulta el desarrollo de las levaduras, pero fomenta el aumento de bacterias. Además, la temperatura de 18°C permite una significativa producción de ácido, estando el pH comprendido entre 3,7 y 3,9 y siendo la Acidez Total Titulable (TTA, del inglés Total Titratable Acidity) de 7,5 meq/100g, aproximadamente. Esta acidez es esencial para purificar la masa madre y evitar el desarrollo de cepas no deseables [17].

Después de cada refresco largo, la masa madre suele bañarse en agua azucarada antes de realizar los siguientes refrescos. Es lo que se denomina el “bagnetto” [20]. Este proceso permite que una parte de la acidez acumulada en la masa migre al agua, desacidificando así la masa madre. De esta forma, se reduce el valor de TTA y se permite así el desarrollo de levaduras. El bagnetto permite también recuperar bastante rápido la temperatura de la masa madre, de 18°C a unos 28°C [17].

Posteriormente, la masa madre se corta en rodajas de 1,5 cm de grosor, para quitarle la capa exterior, y se deja a remojo en agua tibia (de 22 a 35°C) y ligeramente azucarada (de 1 a 5 g/L, según la receta). El tiempo de remojo puede variar de 10 a 40 minutos dependiendo de las recetas y del olor de la masa madre [17].

Al final del bagnetto elimina el exceso de agua y se utiliza esta masa madre para alimentar el primer refresco del día. En caso de que esté bastante húmeda, se suele reducir la cantidad de agua del primer refresco para conseguir una hidratación final de la masa de entre 45 y 50%. Para mayor precisión, puede pesarse la masa madre necesaria antes de ponerla a remojo, y otra vez después de escurrirla, con el fin de ajustar con exactitud la hidratación del refresco y tener en cuenta el agua absorbida durante el bagnetto [17].

5.3.3. Refrescos cortos antes de la producción

Normalmente, tras la fase de bagnetto, se realiza un amasado de unos 5 a 10 minutos en una batidora a velocidad lenta. En casi todos los casos esta masa se lamina y se pliega 3 o

4 veces antes de fermentar, para obtener una masa lisa con una estructura firme y resistente. Tras ello, se procede a realizar los refrescos cortos, estos tienen una duración de 3 a 4 horas, ocurren a unos 30°C y sin envolver la masa. Cuando el pH se encuentra próximo a valores de 4,2, la masa madre está madura y sirve para alimentar al siguiente refresco (Figura 2). La mayor parte de los artesanos hacen tres refrescos cortos para obtener una masa madre lista para la masa final, que puede ser empleada en la producción [17] .



Figura 2. Masa madre durante la elaboración de panettone.

5.3.4. Refrescos largos, fase “de limpieza” o “de conservación”

Tras el último refresco corto del proceso, se extrae una parte del refresco, que sirve de base para el siguiente ciclo de producción.

Después del amasado y el laminado, en previsión de una fase de producción al siguiente día, se realiza la fase de limpieza. Esta consiste en envolver la masa madre y someterla a 18°C durante unas 12 horas para que tenga lugar la fermentación. De forma opuesta, si no se prevé producir al día siguiente, la masa madre se guarda envuelta en la nevera a 5°C alrededor de 1h 30 minutos para su conservación. Con estas condiciones, la fermentación será muy lenta y se podrá preservar la masa madre cerca de un mes sin ser refrescada. Esta etapa se denomina conservación [17].

La técnica de envolver la masa madre es un elemento tradicional del método milanés, que permite obtener una fermentación perfectamente anaeróbica. En el método turinés (o piamontés), la masa madre se bolea tras el laminado y se pone a fermentar en un cubo con agua. En este caso, es el agua el factor que permite formar alrededor de la masa un entorno anaeróbico y mantener una temperatura relativamente estable. Además, permite

intercambios osmóticos con la masa madre (al menos en su superficie), y se reduce así la acidez producida durante el proceso fermentativo. No obstante, aunque el método piamontés es eficaz para la producción (fase de limpieza), no puede emplearse para la fase de conservación, ya que al tratarse de tiempos mayores, la masa madre puede deshacerse en el agua. Por esta causa, en los periodos sin producción, este método es restrictivo y obliga a refrescar la masa madre con más frecuencia que el método milanés [17].

5.3.5. Amasado

De forma general, los métodos de amasado pueden variar en cuanto al orden de incorporación de los ingredientes, pero coinciden en los siguientes puntos:

1. Se busca un perfecto desarrollo del gluten antes de añadir cada ingrediente.
2. La hidratación de las masas se aumenta gradualmente durante el amasado mediante la técnica de “bassinage” (adición de ingredientes líquidos de forma gradual) con huevos o yemas.
3. La mantequilla se incorpora al final en masas sin ingredientes añadidos o justo antes de añadir ingredientes adicionales como frutas secas o cítricos.

Normalmente se realizan dos amasados para la primera masa del panettone, en ambos, la temperatura final de la masa está entre 26 y 28°C y el pH cerca de 5,6 [17].

En el primer amasado se añaden por orden los siguientes ingredientes: azúcar, harina y masa madre, yemas de huevo, mantequilla blanda y agua. Con la adición de cada componente se van realizando amasados de distintos tiempos para conseguir la integración del ingrediente en la masa. Una vez realizado el primer amasado, debe conseguirse una masa bien desarrollada y homogénea, que se denomina primer impasto de panettone.

En el segundo amasado, se intenta que en cada paso la masa llegue a estar muy bien desarrollada. Se añaden azúcar, agua, miel, yemas de huevo, sal y mantequilla. Cuando se haya conseguido una masa homogénea pueden añadirse las frutas u otros ingredientes. Tras el segundo amasado se obtiene una masa denominada segundo impasto.

5.4. Microorganismos presentes en masas madre de panettone

La masa madre de panettone se produce por técnicas tradicionales, sin la necesidad de adicionar levadura de panadería, mediante la propagación diaria los microorganismos se mantienen en un estado activo. Para este proceso se requiere una temperatura ambiente y un pH de aproximadamente 4,0, condiciones que permiten el desarrollo de distintas bacterias y levaduras [21].

En cuanto a las levaduras, estas desempeñan un papel crucial en la masa madre, contribuyendo significativamente al proceso de fermentación y a las características finales del producto. Estos microorganismos evolucionan adaptándose al medio, es decir, deben ajustarse a los factores de estrés del entorno, como son el pH bajo, la alta concentración de hidratos de carbono y el gran número de bacterias lácticas que crecen en las mismas [22]. Se caracterizan por ser los principales responsables de la fermentación alcohólica, en la que los azúcares son transformados en etanol, con producción de gas carbónico. Las poblaciones de levaduras (y en menor grado las bacterias lácticas) producen un aumento del volumen de la masa, debido a la producción de dióxido de carbono (CO₂) que, al expandirse, queda atrapado por la red de gluten, el llamado efecto leudante [23]. Además de su capacidad fermentativa, las levaduras, con o sin la ayuda de las bacterias lácticas, contribuyen al desarrollo de compuestos orgánicos volátiles, como alcoholes, aldehídos, cetonas, hidrocarburos aromáticos, ésteres y acetatos [24].

A causa de su alta capacidad fermentativa y su gran tolerancia a ambientes ácidos, la mayoría de levaduras aisladas de la masa madre pertenecen al phylum Ascomycota, específicamente, a la familia Saccharomycetaceae [19]. Entre estas, *Kazachstania humilis* (anteriormente llamada *Candida milleri* o *Torulopsis holmii*) y *Saccharomyces cerevisiae* son las especies predominantes, encontrándose tanto de manera individual como coexistiendo en la misma masa [25, 26].

Por otra parte, la amplia diversidad de bacterias ácido lácticas que pueden colonizar las masa madre, está determinada por diversos factores intrínsecos que afectan a su crecimiento (temperatura, pH, concentración de NaCl, nutrientes, etc.), así como su capacidad de afrontar situaciones de estrés [1].

En función de su metabolismo fermentativo, las BAL se pueden clasificar en tres grupos: heterofermentativas obligadas, heterofermentativas facultativas y homofermentativas obligadas.

En la homofermentación láctica (ruta EMP o Embden-Meyerhoff-Parnas), las bacterias transforman los azúcares, principalmente glucosa y fructosa, presentes en la masa en ácido láctico, asimismo, dan lugar a residuos aromáticos. Este tipo de fermentación ocurre en ausencia de oxígeno y es llevado a cabo por bacterias homofermentativas y heterofermentativas facultativas [27].

Con respecto a la heterofermentación láctica (ruta de las pentosas fosfato o 6-PG/PK), los azúcares son transformados en ácido láctico, etanol (o ácido acético) y CO₂, apareciendo de igual forma una numerosa cantidad de subproductos aromáticos. Esta fermentación se caracteriza por la producción de gas en forma de CO₂ y es llevada a cabo por bacterias heterofermentativas (estrictas y facultativas). En este caso, además de azúcares de 6 átomos de carbono, estas bacterias pueden fermentar también pentosas [28, 17].

Independientemente de la actividad fermentativa, las bacterias lácticas son capaces de producir exopolisacáridos, también denominados sustancias poliméricas extracelulares (SPE). Estos son sintetizados a partir de azúcares más simples y tienen un papel fundamental en la calidad de los productos elaborados a partir de masa madre [29]. Los SPE realmente interesantes en la elaboración de panettones son los dextranos (compuestos únicamente por unidades de glucosa), o los levanos (compuestos polímeros de fructosa), sintetizados ambos a partir de la sacarosa. Estos compuestos son excretados al exterior de la célula, formando un “gel” protector y desempeñan un papel crucial en las recetas de bollería de masa madre, ya que mejoran el volumen del producto acabado, su esponjosidad y su conservación. Por tanto, controlar las condiciones en las que las bacterias producen estos SPE es de gran importancia en la elaboración de panettones [17].

La especie de bacteria ácido-láctica estudiada más destacada en las masas madre de panettone es *Lactobacillus sanfranciscensis* (actualmente llamada *Fructilactobacillus sanfranciscensis*), que se caracteriza por una elevada actividad acidificante, una alta resistencia a la contaminación microbiana y la producción de gas [30]. Además, *F. sanfranciscensis* es una bacteria heterofermentativa obligada productora de ácido láctico,

por lo que tiene un papel importante en la mejora de las propiedades organolépticas y nutricionales del panettone [22].

Por último, las bacterias ácido lácticas también pueden formar parte de la compleja microbiota de la masa madre. La mayoría de las bacterias del ácido acético pertenecen a los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Estos se caracterizan por oxidar el alcohol etílico a ácido acético, adicionalmente, las pertenecientes al primer género mencionado tienen la capacidad de oxidar el ácido acético a dióxido de carbono posteriormente. Estos procesos contribuyen al desarrollo de sabores característicos en las masas madre. Sin embargo, su presencia puede ser menos común que la de las levaduras y bacterias lácticas en una masa madre típica, y su impacto en el proceso de fermentación puede variar dependiendo de varios factores, como las condiciones de fermentación y los ingredientes utilizados [11].

La microbiota presente en las masas madre empleadas para elaborar los productos tradicionales de panadería dulce ha sido ampliamente estudiada mediante técnicas basadas en el cultivo. En 1973, Galli y Ottogalli [31] llevaron a cabo la primera caracterización microbiana de las masas madre de panettone, identificando aislados de *Lactobacillus brevis* y *Candida milleri* (hoy en día, *Kazachstania humilis*). Adicionalmente, en otro estudio del primer autor (1988) [32] se analizó la microbiología característica de la masa madre de Panettone, encontrando bacterias como *F. sanfranciscensis*, *Lactobacillus brevis* y *Leuconostoc mesenteroides*, además de las levaduras *Starmerella bombicola* y *Saccharomyces exiguus*. En estudios más recientes, se han conseguido aislar otras especies bacterianas como *Lactiplantibacillus plantarum*, *Furfurilactobacillus rossiae*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Leuconostoc citreum* y *Leuconostoc mesenteroides* y las levaduras *Kazachstania humilis* y *Saccharomyces cerevisiae* [7, 33, 34].

6. Materiales y métodos

6.1. Recuento microbiológico y aislamiento de levaduras y bacterias de masa madre

El análisis microbiológico de las masas madre se realizó en el Laboratorio de microbiología del departamento de Biotecnología-Biología Vegetal de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas de la Universidad Politécnica de Madrid.

En este estudio se realizaron diferentes ensayos, en cada uno de ellos se utilizaron tres masas de Panettone (masa madre, primer impasto y segundo impasto) las cuales fueron suministradas por la empresa Marea Bread. Las elaboraciones y refrescos se detallan a continuación (Figura 3).

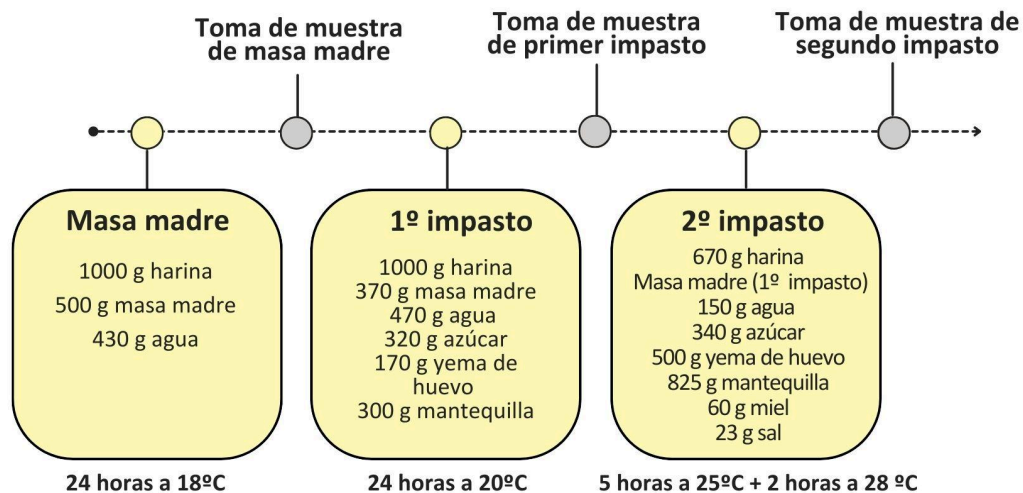


Figura 3. Esquema de elaboración de las tres masas a estudiar.

A partir de 10 g de las masas tomadas en condiciones asépticas en campana de flujo laminar, se homogeneizaron junto con 90 mL de agua peptonada salina (solución de 1 g de peptona, 8,5 g de NaCl y 1 L de agua) en una bolsa estéril con la ayuda de un Stomacher 400 circulator. Este instrumento, especialmente diseñado para el análisis de alimentos, posee dos palas de acción recíproca que aplican presión de golpeo comprimiendo el contenido de la bolsa y logrando la homogeneización del mismo [35]. La homogeneización se realizó programando 150 revoluciones durante 3 minutos. Una vez finalizado este tiempo, se transfirió el contenido líquido a un tubo Falcon estéril, constituyendo este la primera dilución del ensayo (10^{-1}). A partir del mismo se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} , de las cuales se inocularon los volúmenes correspondientes en los distintos medios de cultivo según se describe en la Figura 4. Para los recuentos de levaduras, y bacterias acéticas, los inóculos se hacían en superficie mientras que para las bacterias lácticas, se inocularon en profundidad fueron incubados en jarra de anaerobios con GasPak EZ (referencia 260678). Todas las placas se incubaron a 28°C durante 4-6 días.

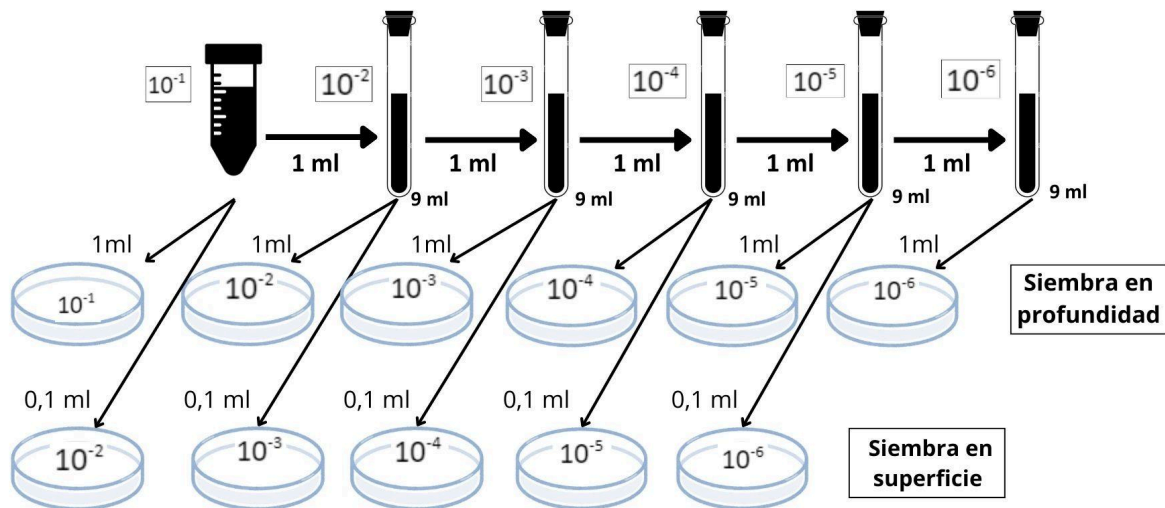


Figura 4. Esquema de diluciones seriadas, siembra en profundidad y superficie.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se llevó a cabo el recuento de colonias que aparecían en cada una de las placas. Para el aislamiento de cultivos puros, se picaron varias colonias de distintas placas con ayuda de palillos estériles y se transfirieron asépticamente a nuevas placas preparadas con los mismos medios con los que habían crecido previamente. Los cultivos puros se congelaron en tubos de 2 mL estériles conteniendo medio líquido y 20% de glicerol.

6.2. Medios de cultivo utilizados en este trabajo

Para los recuentos, aislamientos y mantenimiento de los microorganismos identificados en este trabajo se utilizaron distintos medios de cultivo que se describen a continuación.

6.2.1. Medios para el aislamiento de levaduras

A) Agar Glucosa Cloranfenicol (AGC)

Este medio de cultivo se utilizó con el objetivo de contar y refrescar las levaduras presentes en las masas de panettone. Se trata de un medio que contiene glucosa, extracto de levadura y cloranfenicol como inhibidor del crecimiento de bacterias. Siguiendo las instrucciones de la casa comercial CONDALAB S.A., se disolvieron 40,2 g de medio deshidratado en 1L de agua destilada, y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C . Finalmente, se atemperó en baño hasta $45\text{-}47^{\circ}\text{C}$ y se repartió en placas Petri estériles, dejándose reposar hasta la completa solidificación. Las placas fueron almacenadas en refrigeración a 4°C . La siembra de

las diluciones seriadas descritas más arriba, se realizó en superficie con 100 µL de dilución que se extendió con ayuda de bolas de cristal estériles de 4 mm.

B) Medio cromogénico CHROMagar Cándida

Se trata de un medio de cultivo cromogénico selectivo descrito inicialmente para identificar y diferenciar especies de *Candida* [36], pero que también es adecuado para discriminar levaduras no clínicas [37]. Siguiendo las instrucciones de la casa comercial CONDALAB S.A., se suspendieron 45,9 g de medio en un litro de agua destilada y se mantuvo a 100°C en un baño hasta conseguir la disolución total de este. Posteriormente, se dejó enfriar a 45-47°C y se vertió sobre placas Petri. Una vez solidificadas, se almacenaron en refrigeración entre 4°C. Para la siembra de las diluciones de masas de panettone se realizó como se describe en apartado anterior.

C) Medio YPD (Yeast Peptone Glucose)

Este medio de cultivo se utilizó con el objetivo de refrescar las levaduras presentes en las masas de panettone. Para su preparación, se diluyeron 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, 20 g de glucosa y 15 g de agar en 1 L de agua destilada, y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Finalmente, se atemperó en baño hasta 45-47°C y se repartió en placas Petri estériles, dejándose reposar hasta la completa solidificación. Las placas fueron almacenadas en refrigeración a 4°C.

6.2.2. Medios utilizados para el aislamiento de bacterias acéticas

A) Medio Manitol-Agar + cicloheximida

Este medio de cultivo es adecuado para el crecimiento y aislamiento de bacterias acéticas [38]. Fue preparado con 5 g de extracto de levadura, 3 g de peptona, 25 g de manitol y 15 g de agar, que se disolvieron en 1 L de agua destilada. La disolución fue esterilizada en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Tras ello, se atemperó en baño hasta 45-47°C y se añadieron 10 mL de cicloheximida (10 mg/mL) para evitar el crecimiento de levaduras. Finalmente, se repartió en placas Petri estériles, dejándose reposar hasta la completa solidificación. Estas se almacenaron en refrigeración a 4°C.

B) Medio GYC (de Glucosa, Yeast extract y Carbonato de calcio) + cicloheximida

Este medio de cultivo fue utilizado para el aislamiento de bacterias acéticas [38]. El carbonato cálcico permite la visualización de un halo característico alrededor de las colonias productoras de ácido [39]. Para su preparación se emplearon 100 g de glucosa, 10 g de extracto de levadura, 20 g de CaCO₃ y 15 g de agar, que se disolvieron en 1 L de agua destilada. La disolución fue esterilizada en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Tras ello, se atemperó en baño hasta 45-47°C y se añadieron 10 mL de cicloheximida (10 mg/mL). Finalmente, se repartió en placas Petri estériles, dejándose reposar hasta la completa solidificación. Las placas se almacenaron en refrigeración a 4°C.

C) Medio Universal

Este medio de cultivo fue utilizado para el aislamiento de bacterias. Fue preparado mezclando 5 g de glucosa, 5 g de extracto de levadura, 5 g de peptona, 5 g de extracto de carne, 2 g de fosfato dipotásico y 15 g de agar, que se disolvieron en 1 L de agua destilada. La disolución fue esterilizada en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Tras ello, se mantuvo en baño a 45-47°C y se repartió en placas Petri estériles, dejándose reposar hasta la completa solidificación. Las placas fueron almacenadas en refrigeración a 4°C.

6.2.3. Medio utilizados para el aislamiento de bacterias lácticas

A) Medio MLO (de Medium Leuconostoc oenos) + cicloheximida

El medio MLO permite el crecimiento de bacterias lácticas [40, 41]. Para su preparación en 1 litro de agua destilada se empleó lo siguiente: triptona (10 g), extracto de levadura (5 g), glucosa (10 g), fructosa (10 g), MgSO₄ heptahidratado (0,2 g), MnSO₄ (0,05 g), citrato diamónico (3,5 g), L-cisteína (0,5 g), zumo de tomate filtrado (100 mL) y Tween 80 (1 mL). Tras la disolución de estos reactivos se ajustó a pH 4,8 empleando HCl (1N). En último lugar, se añadió el agar para que quedara a 1,5% y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Se dejó enfriar en baño hasta 45-47°C y se agregaron 10 mL de una solución concentrada de cicloheximida (10 mg/mL) para evitar el crecimiento fúngico. La siembra en este caso se realizó en profundidad. Para ello, se depositó 1 mL de la dilución correspondiente en la placa de Petri estéril y, a continuación, se agregó el medio de cultivo

fundido. Se realizaron movimientos circulares suaves para repartir la biomasa por toda la placa con el fin de lograr un crecimiento homogéneo por toda la placa. Por último, se dejaron enfriar las placas y se incubaron en jarra de anaerobiosis como se describe más arriba.

B) Medio MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) + cicloheximida

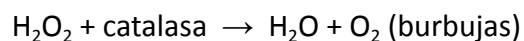
Se utilizó el medio MRS (Cat. 1215) para el recuento de bacterias lácticas. Según las instrucciones de la casa comercial CONDALAB S.A., se suspendieron 52 g de medio en un litro de agua destilada y se añadieron 15 g de agar. Una vez disuelto, se esterilizó en autoclave durante 12 minutos a 121°C. Posteriormente se dejó enfriar en baño hasta 45-47°C y se agregaron 10 mL de una solución concentrada de cicloheximida (10 mg/mL) para evitar el crecimiento fúngico. La siembra se realizó en profundidad, empleando 1 mL de la dilución de muestra. Tras dejar enfriar las placas, se incubaron en jarra de anaerobiosis.

C) Medio MRS5+ cicloheximida

Este medio es adecuado para el desarrollo de bacterias lácticas en condiciones anaeróbicas [42]. Para su elaboración se emplearon 10 g de triptona, 5 g de extracto de carne, 5 g de extracto de levadura, 5 g de glucosa, 10 g de maltosa, 5 g de fructosa, 1 ml de Tween 80, 2,6 g de K_2HPO_4 , 4 g de KH_2PO_4 , 5 g de acetato de sodio, 0,1 g de $MgSO_4$, 0,5 g de L-Cisteína y 15 g de agar, que se suspendieron en 1 litro de agua. La disolución fue ajustada a un pH de 5,8 utilizando ácido clorhídrico (1N). Tras ello se esterilizó en autoclave durante 12 minutos a 121°C. Posteriormente se dejó enfriar en baño hasta 45-47°C y se agregaron 10 mL de una solución concentrada de cicloheximida (10 mg/mL) para evitar el crecimiento fúngico. Además, se añadió 1 mL de un mix de vitaminas, que contenían 0,2 g/L de cada uno de los siguientes compuestos: cobalamina, ácido fólico, ácido nicotínico, ácido pantoténico, fosfato piridoxal y tiamina. Estas vitaminas fueron esterilizadas por filtración. La siembra se realizó en profundidad, empleando 1 mL de la dilución de muestra. Tras dejar enfriar las placas, se incubaron en jarra de anaerobiosis.

6.3. Prueba catalasa y tinción de Gram

Las pruebas de catalasa y la tinción de Gram se utilizaron para distinguir las posibles bacterias lácticas (catalasa -, Gram +) de las acéticas (catalasa +, Gram -) presentes en las masas analizadas. Para la prueba catalasa, se depositaban sobre un portaobjetos 10 microlitros de agua oxigenada al 6% y, con ayuda de un palillo estéril se mezclaba un pegote del cultivo a analizar. Si las bacterias poseen la enzima catalasa aparecen burbujas que se observan a simple vista o con ayuda de una lupa:



Para la tinción de Gram se suspendió la colonia en una gota sobre el portaobjetos y se fijó con el calor de la llama. Posteriormente, se tiñó con cristal violeta y, transcurrido un minuto se realizó un lavado con agua destilada. Después, se añadió la solución yodada de lugol durante 30 segundos. Tras realizar otro lavado con agua, se trató con alcohol durante 30 segundos. A continuación, se lavó de nuevo y se añadió safranina (30 segundos). Por último, se realizó otro lavado y se observaron las muestras al microscopio. Las bacterias Gram - aparecen teñidas de rosa mientras que las bacterias Gram + aparecen teñidas de color violeta.

6.4. Caracterización molecular de los microorganismos aislados por PCR

La identificación de los géneros y/o especies aisladas se realizó mediante la secuenciación de fragmentos de DNA procedentes de sus genomas amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La extracción del DNA genómico de bacterias y levaduras se realizó mediante el calentamiento a 100 °C durante 10 minutos de una suspensión de células tomadas con un palillo estéril a partir de una placa en 100 µL de agua destilada estéril. A continuación, se sometieron a un choque térmico al depositar los tubos en hielo y posteriormente se centrifugaron a 10000 revoluciones durante 2 minutos. Como molde para la reacción de PCR se emplearon 2 µL del sobrenadante.

En el caso de levaduras, para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa se emplearon los cebadores ITS (Internal Transcribed Spacer). La región ITS se encuentra en el

ARN ribosomal (ARNr), entre los genes 18S, 5.8S y 28S y se caracteriza por ser altamente variable entre diferentes especies de levaduras, lo que la convierte en una eficaz herramienta para la identificación y la caracterización molecular de levaduras a nivel de especie [43, 44]. Por otra parte, para la PCR de bacterias se emplearon los cebadores CS1 y CS2 (Secuencias Comunes, del inglés Common Sequences). Estos primers se unen a regiones conservadas en la región 16S del ARNr de las distintas especies bacterianas, lo que permite su identificación [45]. En ambos casos se empleó el kit de PCR de Taq DNA polimerasa de la casa comercial Applied Biological Materials (ABM). A continuación se describen en una tabla (Figura 5) las cantidades de los reactivos que se utilizaron en las reacciones de PCR realizadas:

	Control	Levadura		Control	Bacteria
H2O	37 μ L	35 μ L	H2O	37 μ L	35 μ L
5X Taq Buffer	10 μ L	10 μ L	5X Taq Buffer	10 μ L	10 μ L
dNTPs	1 μ L	1 μ L	dNTPs	1 μ L	1 μ L
ITS-1 [25 pmol/mL]	1 μ L	1 μ L	CS1 [25 pmol/mL]	1 μ L	1 μ L
ITS-4 [25 pmol/mL]	1 μ L	1 μ L	CS2 [25 pmol/mL]	1 μ L	1 μ L
Taq DNA Polymerase	1 μ L	1 μ L	Taq DNA Polymerase	1 μ L	1 μ L
DNA	-	2 μ L	DNA	-	2 μ L

Figura 5. Cantidades de reactivos empleados para la reacción de PCR.

Estos tubos se colocaron en el termociclador BIOMETRA T1 THERMOCYCLER T-1 THERMOBLOCK y se estableció un programa que constaba de las siguientes etapas:

- 1) Desnaturalización inicial del DNA: 3 minutos a 94°C.
- 2) 35 ciclos repetidos que constan de las siguientes fases: 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 55°C (hibridación) y 1 minuto a 72°C (extensión).

La separación de los productos de PCR amplificados se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa. Para preparar el mismo, se añadieron 1,8 g de agarosa a un matraz al que posteriormente se le añadieron 120 mL de TAE al 10% (Tris, Acetato y EDTA). Se calentó en el microondas durante 2 minutos hasta que la mezcla estaba completamente disuelta. Tras ello, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 2 μ L de SybrSafe (referencia S33102), que permitía la visualización de los fragmentos de DNA a la luz UV. Por último, se vertió el contenido del matraz en el soporte previamente colocado con el peine de pocillos y se dejó hasta su solidificación.

Para la carga del gel, se añadieron 2 μ L de azul de carga (3,5 mL H₂O, 6 mL glicerol 60%, 0,5 mL EDTA (20 mM, pH 8) y 2,5 mg de azul de bromofenol 0,25%) a cada tubo eppendorf, al que después se le añadieron 12 μ L de cada muestra de PCR. El contenido de cada tubo se depositó cuidadosamente en el gel de agarosa colocado en la cuba de electroforesis.

Para la visualización de los fragmentos de DNA, el gel se colocaba en el equipo Gel Doc EZ de Bio-Rad junto con el programa Image Lab Software.

Las muestras de las reacciones de PCR que contenían una banda de DNA única eran enviadas a la empresa StatVida para su secuenciación. El análisis de los cromatogramas enviados por esta empresa se realizaba mediante el programa BioEdit. Para la identificación de las especies aisladas, se realizaba un análisis BLAST de cada uno de ellos en la web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

6.5. Microfermentación de bacterias aisladas en viales

Para averiguar el tipo de fermentación, homoláctica o heteroláctica, que realizaban las bacterias aisladas en este trabajo se realizaron microfermentaciones en viales de 10 ml de capacidad, añadiendo 8 mL de medio de MRS5 líquido con distintos azúcares: 4% glucosa, 4% de fructosa o 4% de maltosa, respectivamente.

Para ello, se realizó un preinóculo de las tres bacterias estudiadas (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus lactis*), en tubos estériles con 5 mL de MRS5. Una vez crecidas a saturación, se tomaron 160 μ L de cada tubo y se trasladaron a los viales estériles con 8 mL de cada medio de cultivo. Los viales se cerraban herméticamente con ayuda de tapones de goma estériles y en cada vial se colocaba una aguja de 0,90x40 mm para permitir la salida de CO₂. Los viales se pasaban a tiempo cero, se incubaron a 28 °C y se realizaba el seguimiento del peso de los mismos durante 5 días. La diferencia de peso observada era indicativo de la fermentación heteroláctica, en la que se produce desprendimiento de CO₂ (y por tanto, pérdida de peso del vial).

Una vez terminada la fermentación, los viales se agitaban para resuspender las células presentes y se tomaba 1 mL de cada vial para medir la densidad óptica (DO), como método de estimación del crecimiento microbiano. Las medidas se realizaban en el Densitómetro Harvard Biochrom 80211630 a 600 nm.

6.6. Determinación de acidez total y determinación enzimática de ácido L-láctico, D-láctico y ácido acético.

La determinación de acidez total de los viales se realizó mediante volumetría ácido-base por valoración con una disolución de NaOH. Para ello, se tomaron 1,2 mL de cada vial y se centrifugaron durante 3 minutos a 20000 rpm. Posteriormente, se añadió 1 mL del sobrenadante a 9 mL de agua. Esta mezcla se neutralizó con una solución de NaOH 0,04 N, utilizando fenolftaleína como indicador de pH. De esta forma, pudo calcularse la cantidad (g/L) de ácido láctico producido por cada microorganismo.

Por otra parte, se evaluó la cantidad de ácido acético, ácido D-láctico y L-láctico producidos por las bacterias. Para analizar el contenido de ácido acético producido, se tomaron 300 µL del contenido del vial y se depositaron en una cubeta específica para esta medición. Para medir el contenido de los isómeros de ácido láctico, se realizó una dilución 1:10, empleando 100 µL de muestra y 900 µL de agua destilada estéril. Estos ácidos orgánicos fueron analizados en el Multianalizador Enzimático Y25 de Biosystems empleando los kits de Ácido Acético (Ref. 12810), Ácido D-Láctico (Ref. 12801) y Ácido L-Láctico (Ref. 12802) de la misma empresa.

7. Resultados y discusión

En el transcurso de este estudio, se llevaron a cabo diversos ensayos con el fin de ajustar y optimizar los procedimientos experimentales y obtener resultados confiables y reproducibles. Las resoluciones de cada prueba permitieron definir un método final del que se obtuvieron la mayoría de los resultados de este estudio.

7.1. Puesta a punto de los medios de cultivo para el aislamiento de levaduras

Con el objetivo de aislar las levaduras presentes en las masas de panettone y tener una idea de las poblaciones pertenecientes a distintas especies, se ensayó el procedimiento de aislamiento microbiológico de dilución y vertido en placa utilizando los medios de cultivo YPD, AGC y CHROMagar Candida (ver apartado 6.2.1 de Materiales y Métodos). Este último medio permite la diferenciación e identificación de diversas especies de levaduras del género Candida, ya que las colonias adquieren diferentes colores al metabolizar el sustrato del

medio. Para la siembra, se realizaron una serie de diluciones decimales en agua peptonada, desde 10^{-2} hasta 10^{-6} . Los resultados de los recuentos indicaron que el número de colonias de levadura que aparecían en los medios fue aproximadamente el mismo, si bien el aspecto fue muy distinto. Mientras que en YPD todas las colonias aparecían blancas y de aspecto mantecoso, en el medio cromogénico curiosamente, aparecían una mayoría de colonias de color blanquecino en el exterior y el centro color púrpura, que con el tiempo de incubación se hacía muy intenso. Además, de forma minoritaria aparecían otras colonias más pequeñas y de color morado pálido, que con el tiempo se hacía más intenso (Figura 6, a)).

A la vista de que con los dos medios ensayados se obtenía el mismo número de colonias se decidió seguir trabajando con el medio cromogénico para los recuentos y el aislamiento de levaduras ya que permitía distinguir diferentes levaduras según el aspecto y color de la colonia. Tras el aislamiento de diferentes colonias en medio cromogénico y su crecimiento en zig zag, se comprobó que algunas de las mismas poseían color morado y otras color blanquecino, lo que hizo pensar que se trataba de una contaminación. (Figura 6, b)).

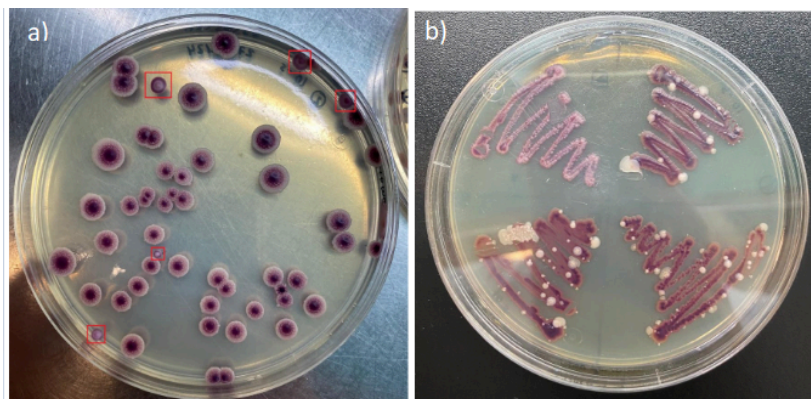


Figura 6. a) Colonias crecidas en medio Cromogénico CHROMagar Candida. En la imagen se observan dos tipos de colonias fácilmente distinguibles: la más abundante, de borde blanquecino y centro morado intenso y otras más pequeñas y minoritarias de color morado pálido, señaladas con un cuadrado. b) Siembra en zig zag de colonias aisladas de distintas muestras.

La caracterización molecular mediante PCR de colonias aisladas blancas y moradas a partir del mismo zig zag (Figura 6, b)) demostró que ambas colonias pertenecían a la misma levadura (ver más adelante en el apartado 7.4. sobre la caracterización molecular de levaduras).

7.2. Puesta a punto de los medios de cultivo para aislar y diferenciar bacterias acéticas y lácticas

Con el fin de aislar y distinguir las poblaciones de bacterias presentes en las masas de panettone, se seleccionaron los medios GYC, Manitol-Agar y Universal para el crecimiento de bacterias acéticas en condiciones aeróbicas, y los medios MLO, MRS y MRS5 para bacterias lácticas, para los cuales se establecieron condiciones de ausencia de oxígeno empleando la jarra de anaerobiosis. Se realizaron diluciones de cada masa en agua peptonada de 10^{-2} hasta 10^{-6} , en el caso de siembra en superficie, y de 10^{-1} hasta 10^{-6} en el caso de siembra en profundidad. Tras 2-3 días de incubación a 28°C aparecieron colonias en todos los medios de cultivo ensayados. Los resultados de los recuentos indicaron valores semejantes de colonias contadas en medios distintivos para bacterias acéticas y lácticas, lo que resultaba inusual ya que, en las masas madre hay una predominancia de bacterias lácticas.

Para verificar el crecimiento de bacterias acéticas en los medios correspondientes a las mismas, se aislaron 20 colonias aleatorias de los medios GYC y Manitol, las cuales se emplearon para la realización de tinciones de Gram y pruebas catalasa.

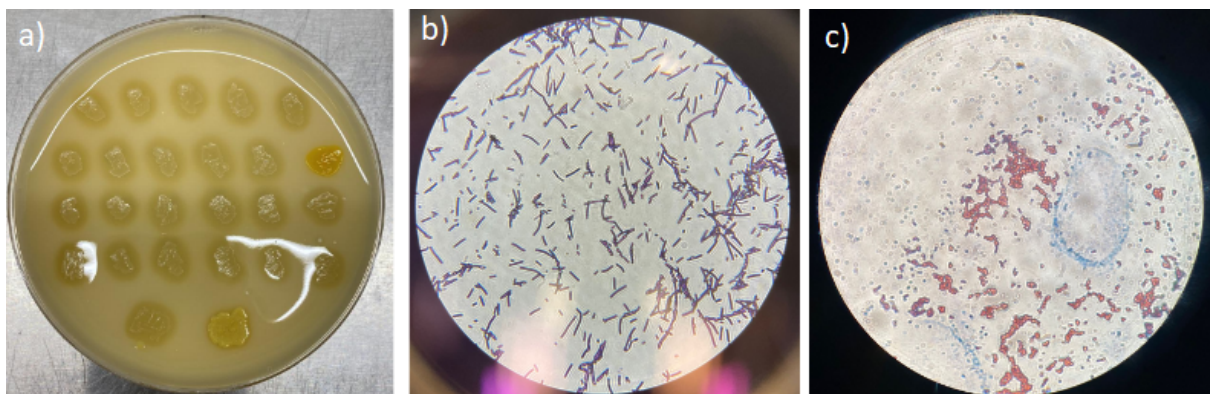


Figura 7. a) Cultivos refrescados procedentes de colonias aisladas de GYC. b) y c) Ejemplos de Tinción de Gram (+) y (-) respectivamente de algunas de las bacterias aisladas.

Las tinciones de Gram dieron como resultado que alguna de las bacterias aisladas eran Gram negativas (con coloración rosa, candidatas a ser bacterias acéticas), pero curiosamente otras eran Gram positivas (color púrpura o violeta) (Figura 7, b) y c)). Así mismo, no todas las colonias mostraron la aparición de burbujas típicas de la prueba catalasa positiva esperable para las bacterias acéticas. Tan solo 4 de las 20 bacterias aisladas del medio GYC mostraron un notorio color rosa en las tinciones y un resultado positivo en la prueba catalasa. En la

placa original, estas colonias presentaban un color diferenciado con respecto al resto, mostrándose cremosas y de colores naranjas, amarillos o blanco oscuro (Figura 7, a)).

Con el objetivo de diferenciar las bacterias acéticas de las lácticas que habían crecido en los distintos medios de cultivo, se evaluó el crecimiento de las mismas en medios de cultivo con distintas concentraciones de penicilina. Este antibiótico es particularmente efectivo contra las bacterias lácticas (Gram positivas) [46], mientras que las bacterias acéticas son menos sensibles a la penicilina [47] y por tanto capaces de crecer en su presencia. Para este procedimiento se emplearon placas con medio GY (similar al GYC pero sin carbonato cálcico) con distintas concentraciones de penicilina: 3,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cada placa se inoculó con bacterias acéticas y lácticas de la colección del laboratorio, empleadas como controles positivos, y con bacterias aisladas de los medios GYC y MRS respectivamente. Como se observa en la Figura 8, las bacterias acéticas de colección crecieron en presencia de penicilina, pero no aquellas procedentes de las masas madre de panettone. De nuevo, estos resultados sugerían la posibilidad de que las bacterias aisladas en los medios de cultivo descritos para bacterias acéticas, realmente no fueran acéticas sino lácticas. En cuanto al crecimiento de las bacterias lácticas en los medios con penicilina y como era de esperar, no se observó crecimiento de ninguna bacteria láctica de colección ni de aquellas provenientes del medio MRS .

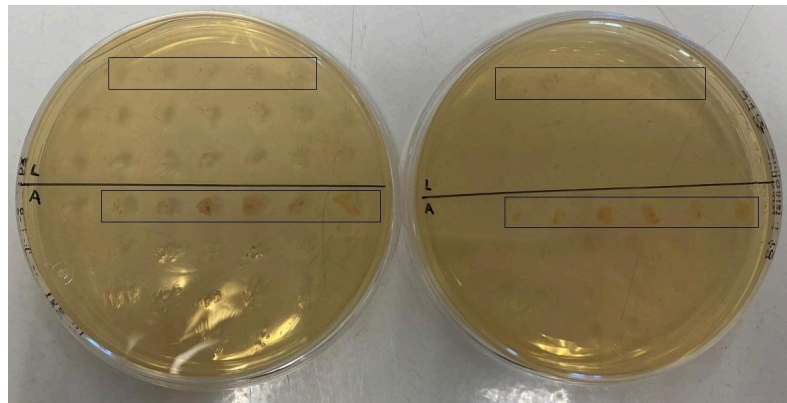


Figura 8. Siembra de bacterias en medio MRS con penicilina (3,6 y 0,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente). En la mitad superior de ambas placas se sembraron bacterias lácticas de colección, empleadas como control (señaladas con un rectángulo) y bacterias provenientes de MRS, en ningún caso hubo crecimiento. En la mitad inferior de ambas placas se sembraron bacterias acéticas de colección (señaladas con un rectángulo), que crecieron. No crecieron las bacterias provenientes de GYC.

Para averiguar si las bacterias que habían sido aisladas en los medios GYC y Manitol agar pudieran ser lácticas, se inocularon directamente bacterias lácticas de la colección del

laboratorio en dichos medios en superficie y se incubaron a 28°C mostrando un claro crecimiento. Estos resultados hicieron pensar que las bacterias que aislamos como “bacterias acéticas” eran realmente lácticas, que debían ser la mayoría en las masas, lo que sugería la dificultad de aislar acéticas de nuestras masas. Estos resultados nos llevaron a centrar nuestro estudio de recuentos y aislamiento de bacterias del panettone en las bacterias lácticas.

Se comprobó consultando bibliografía que el medio MRS5, enriquecido en vitaminas, permitía el óptimo crecimiento de bacterias lácticas en general y de *F. sanfranciscensis* en particular [48]. Como esta bacteria en principio podía estar presente en nuestras masas de panettone porque está descrito como microorganismo predominante en dichas masas [49], se decidió emplear este medio de cultivo en los ensayos posteriores.

En cuanto a aquellas cuatro bacterias que resultaron ser Gram (-) y catalasa positivas mencionadas más arriba, se secuenció un fragmento de su DNA genómico para averiguar su identidad. Los resultados de estas secuencias indicaron que las bacterias correspondían a *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Frigoribacterium* y *Kocuria rhizophila*. Estos microorganismos han sido encontrados en estudios de calidad microbiológica del pan [50], su presencia en este tipo de alimentos indica una contaminación por manipulación humana, sedimentación de partículas del aire, material o materias primas con las que las masas habían podido estar en contacto [11].

7.3. Recuentos de levaduras y bacterias lácticas

En la repetición de distintos ensayos se observó que la población del conjunto de levaduras y bacterias era mayor en la masa madre inicial, presentando valores de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) del orden de 10^9 por gramo de masa. Al inicio, cuando la masa madre se prepara, hay una abundancia inicial tanto de bacterias como de levaduras debido a la riqueza de nutrientes disponibles en el medio, siendo las cifras ligeramente mayores en el caso de las bacterias (Figura 9).

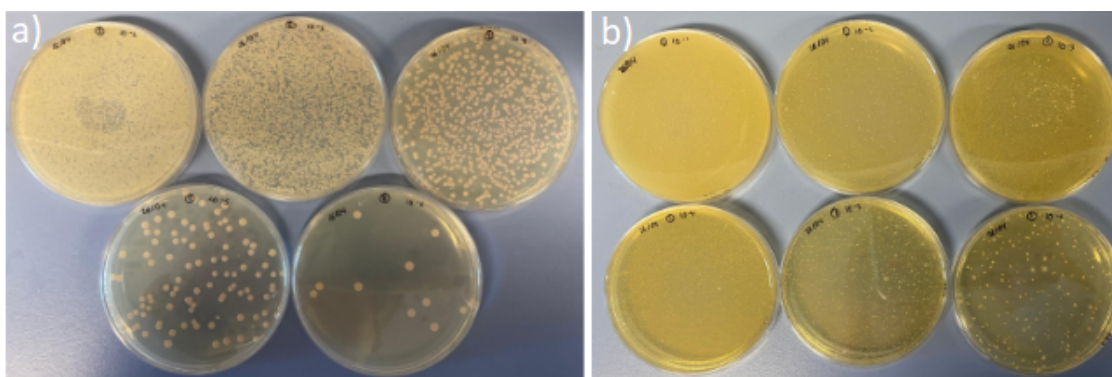


Figura 9. a) Recuento de levaduras en medio Cromogénico CHROMagar Candida, diluciones 10^{-2} a 10^{-6} . b) Recuento de bacterias lácticas en medio MRS5, diluciones 10^{-1} a 10^{-6} .

Con el avance de la fermentación y la formación del primer impasto, las UFC bacterianas se redujeron tres órdenes de magnitud (Figura 10). De otra forma, el valor de UFC de levaduras sólo se redujo un orden de magnitud. En cuanto al segundo impasto, la población de bacterias se mantuvo en el mismo orden de magnitud (10^6 UFC/g), mientras que la de levaduras volvió a incrementarse a 10^9 UFC/g (Figura 11).

	MM	1º impasto	2º impasto
Levaduras (UFC/g)	$1,9 \times 10^9$	$9,9 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$
Bacterias (UFC/g)	3×10^9	$1,7 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$

Figura 10. Tabla de recuento de UFC/g en cada masa.

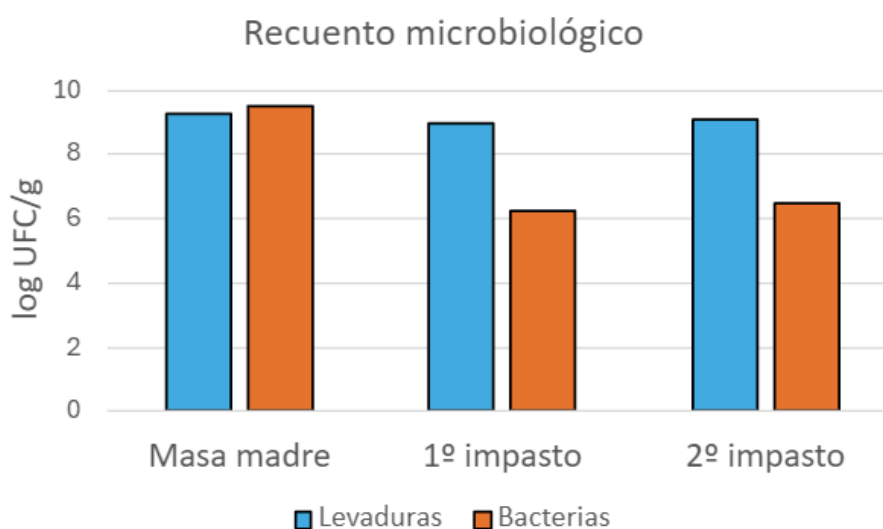


Figura 11. Evolución de UFC/g de bacterias y levaduras en las masas de panettone.

Como ya se ha comentado, la riqueza inicial de nutrientes en el medio permite el desarrollo de un elevado número de microorganismos. La predominancia de población bacteriana puede explicarse por la capacidad de estas para metabolizar la maltosa, a diferencia de las

levaduras. Por tanto, estos microorganismos únicamente pueden metabolizar los azúcares más simples de la masa madre [17, 51].

De otra forma, la mayoría de las bacterias lácticas, sí que pueden asimilar e hidrolizar la maltosa, dando lugar a moléculas de glucosa que las levaduras emplean para producir aminoácidos esenciales para el desarrollo de las bacterias lácticas [30, 51]. En el primer impasto, la población de levaduras sufrió un detrimento menor que la de bacterias, probablemente porque al refrescar la masa, el medio ya contenía moléculas de glucosa liberadas por las BAL. Por tanto, la cohesión entre bacterias y levaduras es fundamental para la estabilidad y funcionalidad del ecosistema microbiano que se desarrolla en las masas. Durante la formación del segundo impasto, la adición de nuevos ingredientes sirven de sustrato y reactivación de los microorganismos presentes en el medio. En esta etapa, las poblaciones de ambos tipos de microorganismos aumentaron, aunque las levaduras eran predominantes sobre las bacterias, es en esta masa donde se establece un equilibrio entre las poblaciones microbiológicas.

La evolución de la flora microbiana en la masa madre y durante las etapas de la elaboración de panettone desempeña un papel crucial para el desarrollo de su sabor, textura y características únicas [23]. El crecimiento y desarrollo de las BAL está vinculado a la disponibilidad de azúcares en el medio, pero mientras estos estén presentes en concentraciones adecuadas, todo depende de la disponibilidad de aminoácidos, que aumenta cuando las BAL crecen en asociación con levaduras, ya que algunas especies de levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* suelen liberar estos compuestos al medio. En presencia de NH_4Cl y aminoácidos, las levaduras tienen preferencia por el primer compuesto como fuente de nitrógeno, lo que permite el aumento de la actividad de las BAL y determina una correcta acidificación de la masa [52].

En estudios sobre recuentos de masa madre, también se observó un detrimento en las poblaciones de BAL durante las distintas etapas de fermentación. Este fenómeno es asociado al descenso del pH y al aumento en la concentración de ácido láctico y etanol, lo que supone la supervivencia única de especies de BAL capaces de adaptarse a un ambiente más ácido y competitivo [3, 21].

Por otra parte, en los análisis bibliográficos sobre levaduras, estas tienden a aumentar lentamente alcanzando un máximo en la masa correspondiente a la última fase del proceso fermentativo [53]. Sin embargo, en nuestro estudio, la población de levaduras no tuvo este incremento al final de la fermentación, más bien evolucionó poco de un refresco a otro. Probablemente, la estabilidad de esta población se deba al aumento de levaduras salvajes, que son más tolerantes a las condiciones de pH y cantidad de láctico y etanol [54].

7.4. Caracterización molecular de los microorganismos aislados de masas de panettone por PCR y secuenciación

7.4.1. Resultados de secuenciación de fragmentos de DNA genómico de las levaduras aisladas

Con el objetivo de identificar las levaduras aisladas que daban esos dos tipos distinguibles de colonias en el medio cromogénico (Figura 6, b)), se purificó el DNA genómico de varias colonias y se realizó la secuenciación de fragmentos de DNA genómico amplificados por PCR según se describe en Materiales y Métodos (ver apartado 6.4.). En los geles de electroforesis se distinguían dos bandas, en torno a 700 y 500 pares de bases (Figura 12), lo que sugería que se trataba de dos especies de levaduras.

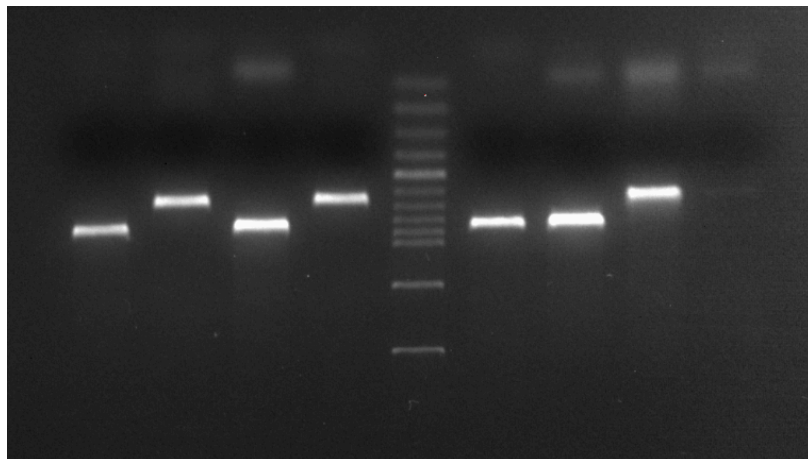


Figura 12. Electroforesis de fragmentos de DNA genómico amplificado por PCR procedentes de levaduras aisladas.

Tras el análisis bioinformático de las secuencias, se confirmó que la banda en torno a los 700 pb correspondía a la levadura *Kazachstania humilis* mientras que la banda de menor número de pares de bases correspondía a *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 13). Estas levaduras estaban presentes tanto en la masa madre como en el primer y segundo impasto. Se

comprobó que la primera de las levaduras mencionadas era la mayoritaria en todas las muestras que correspondía a la colonia de forma circular, con el centro de color morado y el borde blanco.

Ambas levaduras pertenecen al Phylum Ascomycota y, en concreto, a la familia Saccharomycetaceae y, por lo general, son las especies predominantes, tanto por separado como cohabitando una misma masa madre [25, 26]. Destacan por ser tolerantes a la acidez, pero difieren en el metabolismo de la maltosa. Mientras que *S. cerevisiae* es maltosa positiva, *K. humilis* no tiene esta capacidad de asimilar el disacárido [55].

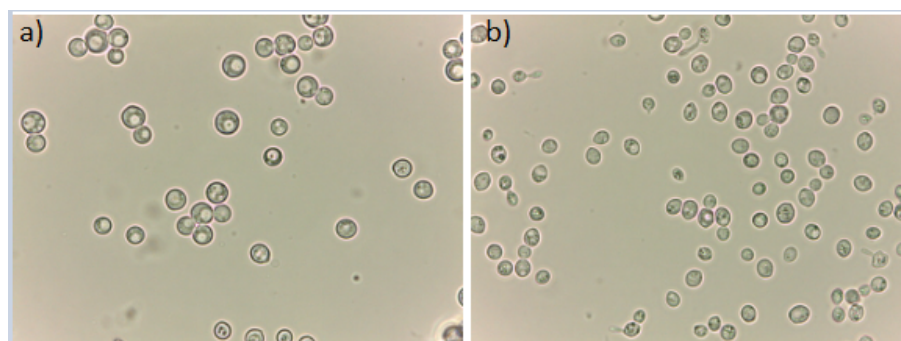


Figura 13. Observación al microscopio de campo claro (100 aumentos) las levaduras aisladas y secuenciadas: a) *S. cerevisiae* y b) *K. humilis*.

7.4.2. Resultados de secuenciación de fragmentos de DNA genómico de bacterias lácticas aisladas

Con el objetivo de tener una muestra representativa de las bacterias predominantes aisladas de cada masa, se aislaron 10 colonias de cada una de las muestras. Los resultados del total de colonias secuenciadas de la masa madre indicaron que la bacteria mayoritaria era *F. sanfranciscensis*. En el primer impasto analizado, también se confirmó que esta especie era predominante, sin embargo, los resultados de la secuenciación indicaron que dos de las diez colonias correspondían a *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus lactis* respectivamente (Figura 14). En cuanto al segundo impasto, tan solo una de las colonias aisladas de esta muestra confirmó tratarse de *F. sanfranciscensis*, este microorganismo fue reemplazado por bacterias de otros géneros. Se obtuvieron por tanto, seis colonias de *L. mesenteroides*, dos ejemplares de *L. lactis*, y uno de *Priestia megaterium*.

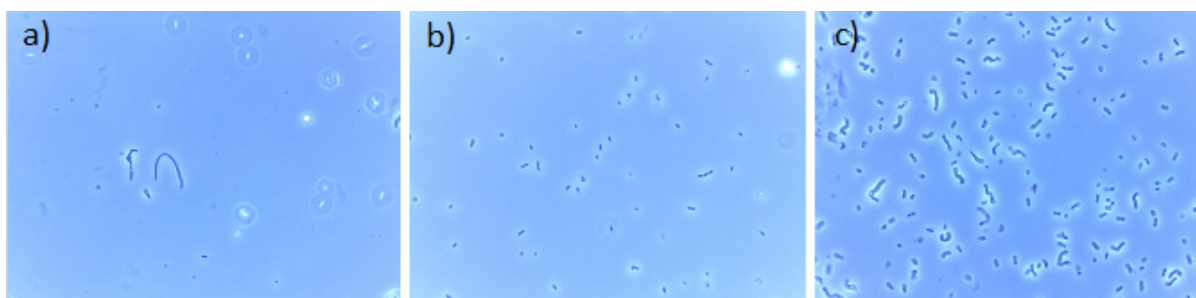


Figura 14. Observación al microscopio con contraste de fases de bacterias lácticas aisladas y secuenciadas: a) *F. sanfranciscensis*, b) *L. mesenteroides* y c) *L. lactis*

En diversos estudios sobre aislamientos de bacterias lácticas, ha quedado reflejado como el microorganismo predominante en masa madre es la especie *F. sanfranciscensis* [56, 57, 58]. Este tiene un metabolismo específicamente adaptado para crecer, desarrollarse y competir con otras BAL [59]). En la masa madre inicial, centenares de bacterias minoritarias cohabitan con *F. sanfranciscensis*, pero constituyen a menos del 1% del total de las bacterias. Sin embargo, a lo largo del amasado del primer y segundo impasto, la población de esta especie va decreciendo, dejando su lugar al desarrollo de algunos fermentos minoritarios, como los géneros de *Weissella*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus* [17].

En cuanto a la especie mayoritaria en el segundo impasto, *L. mesenteroides*, puede estar presente en diversos alimentos fermentados, como vino, queso, mantequilla, leche, kéfir, kimchi y chucrut, contribuyendo a las mejoras nutricionales y sensoriales de estos productos [60]. Por otra parte, también ha sido estudiado por su capacidad de producir bacteriocinas [61, 62] y exopolisacáridos [63].

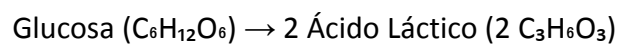
A su vez, *Lactococcus lactis* además de estar presente en masas madre, es ampliamente utilizado para la elaboración de productos lácteos fermentados [64]. Adicionalmente, ha sido estudiado por su efectividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos patógenos y por su efecto probiótico [65].

En cuanto a *Priestia megaterium*, esta bacteria ha sido empleada como organismo modelo en el ámbito genético y la producción de proteínas recombinantes [66, 67]. Aunque no se trata de una bacteria ácido-láctica, recientemente ha sido reportada por aportar consistencia al pan de masa madre [68].

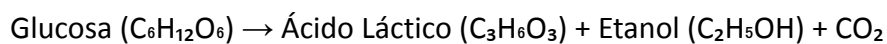
7.5. Estudio de la capacidad fermentativa de las bacterias aisladas

Como ya se ha comentado anteriormente, las bacterias lácticas pueden clasificarse en homofermentativas y heterofermentativas, dependiendo de los productos que generan durante la fermentación de azúcares. Ambos tipos de bacterias producen ácido láctico, pero sus rutas metabólicas y productos finales son diferentes [69].

Las bacterias homofermentativas utilizan la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) produciendo principalmente ácido láctico como único producto en la fermentación de azúcares. Así, cada mol de glucosa es transformado en dos moles de ácido láctico [70].



De otra manera, en la heterofermentación, a través de la vía de las pentosas fosfato, se producen una mezcla de productos, incluyendo ácido láctico, etanol o acetato, y dióxido de carbono (CO₂). De tal forma que menos del 50% de los productos finales es ácido láctico, siendo el resto una combinación de etanol/acético y CO₂ [71].



Con el objetivo de caracterizar el metabolismo de las bacterias lácticas aisladas en este trabajo nos propusimos estudiar su capacidad fermentativa en microviales determinando la mayor (fermentación heteroláctica) o menor/ausencia (fermentación homoláctica) de producción de CO₂ por diferencia de peso. Además, se estudió la capacidad de las bacterias para utilizar distintos azúcares como la glucosa, maltosa y fructosa. Para ello, se eligieron dos aislados de bacterias caracterizadas como *Lactococcus lactis*, tres aislados de *Fructilactobacillus sanfranciscensis* y tres aislados de *Leuconostoc mesenteroides*.

Los resultados indicaron que mientras que *Lactococcus* apenas produce CO₂ (indicativo de una fermentadora homoláctica), tanto *F. sanfranciscensis* como *Leuconostoc* mostraron una mayor liberación de CO₂, resultado de su metabolismo heteroláctico (Figura 15), siendo la maltosa el sustrato con el que se observó una mayor producción. Está descrito que las cepas de *F. sanfranciscensis* utilizan preferentemente maltosa y, por lo general, no pueden fermentar la fructosa [72] y nuestros resultados lo confirman. Este microorganismo no utiliza fructosa como fuente de energía, sino como aceptor de electrones, reduciéndose así a manitol y regenerando NADH a NAD [73, 74]. Esta adaptación metabólica permite mantener

el equilibrio redox en el interior celular, al ser el manitol un producto con efecto antioxidante, más estable y menos reactivo que el ácido láctico [75]. Estos resultados confirman el comportamiento metabólico conocido para las tres bacterias estudiadas y demuestran que el procedimiento utilizado experimentalmente es adecuado para su caracterización.

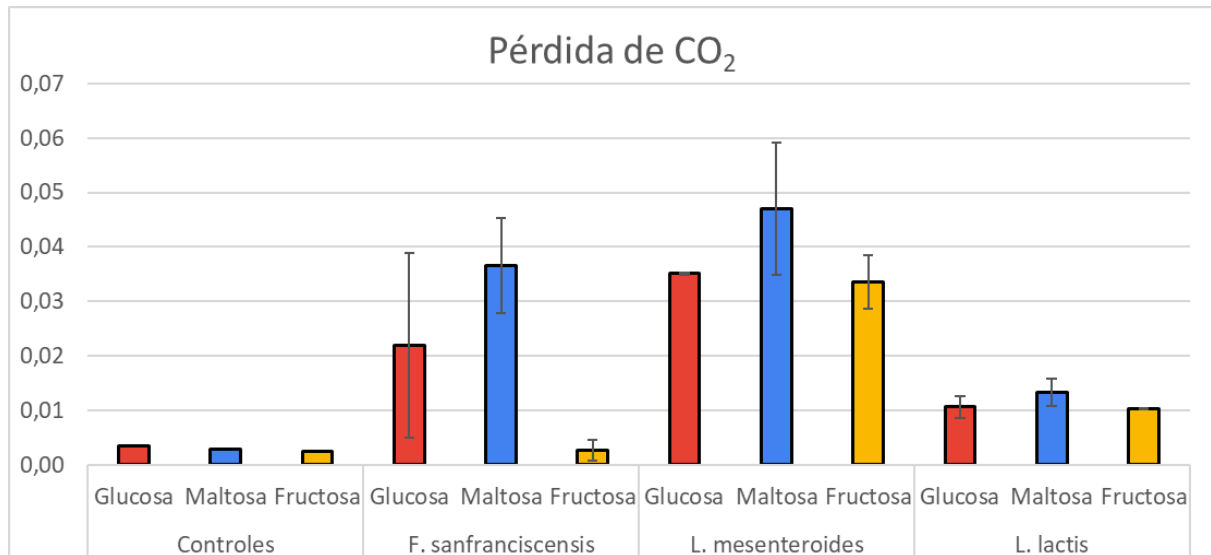


Figura 15. Pérdida de CO₂ (g) de las bacterias lácticas aisladas en glucosa, maltosa y fructosa resultado de la fermentación. Los controles son viales con el medio de cultivo sin inocular.

Después de varios días de incubación, se determinó la densidad óptica (DO) como medida de estimación del crecimiento bacteriano que se alcanza en presencia de los distintos azúcares. Como se observa en la Figura 16, tanto *L. mesenteroides* como *L. lactis* asimilaron y crecieron en presencia de los tres azúcares mientras que *F. sanfranciscensis* sólo lo hizo en presencia de glucosa y maltosa. Se ha descrito en la literatura que existe gran diversidad metabólica en la asimilación de azúcares en esta bacteria, existiendo cepas que asimilan y otras que no la fructosa [76]. En el caso de nuestros aislados curiosamente pertenecen al grupo de los que no utilizan este azúcar. Estos resultados explican el que no se observe fermentación heteroláctica en presencia de fructosa (Figura 15).

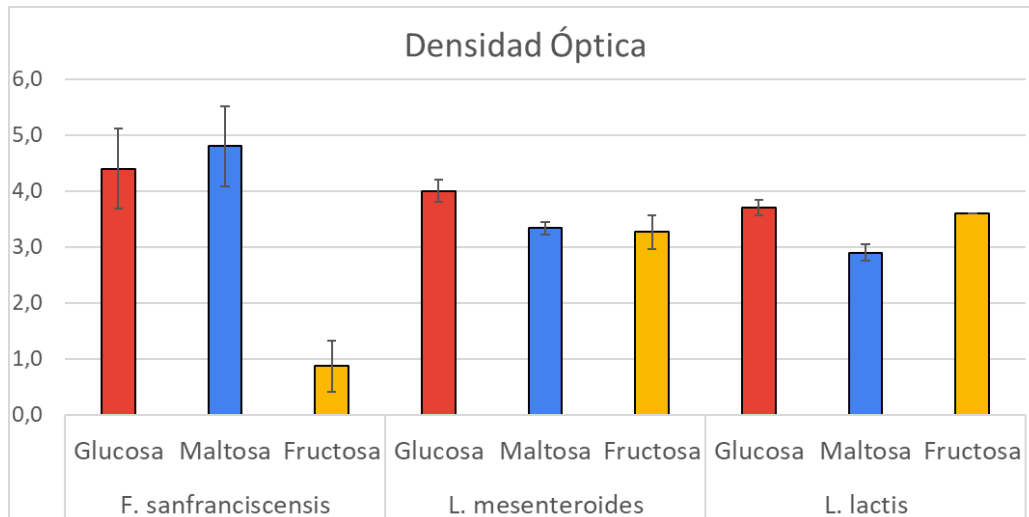


Figura 16. Crecimiento de *F. sanfranciscensis*, *L. mesenteroides* y *L. lactis* en el ensayo de fermentación. Se representan los valores de Densidad óptica (DO) alcanzados al final del ensayo.

7.6. Determinación de acidez total y determinación enzimática de ácido L-láctico, D-láctico y ácido acético.

Otra medida alternativa para evaluar la capacidad fermentativa llevada a cabo por las bacterias es mediante la determinación de acidez. Siguiendo los pasos descritos en el apartado 4.5., se llevó a cabo titulación ácido-base para determinar la acidez total producida por cada bacteria (Figura 17).

Como ya se ha comentado en lo referente a *F. sanfranciscensis*, la incapacidad de fermentación en presencia de fructosa (Figura 15) se vió reflejada en la ausencia de producción de acidez (Figura 17).

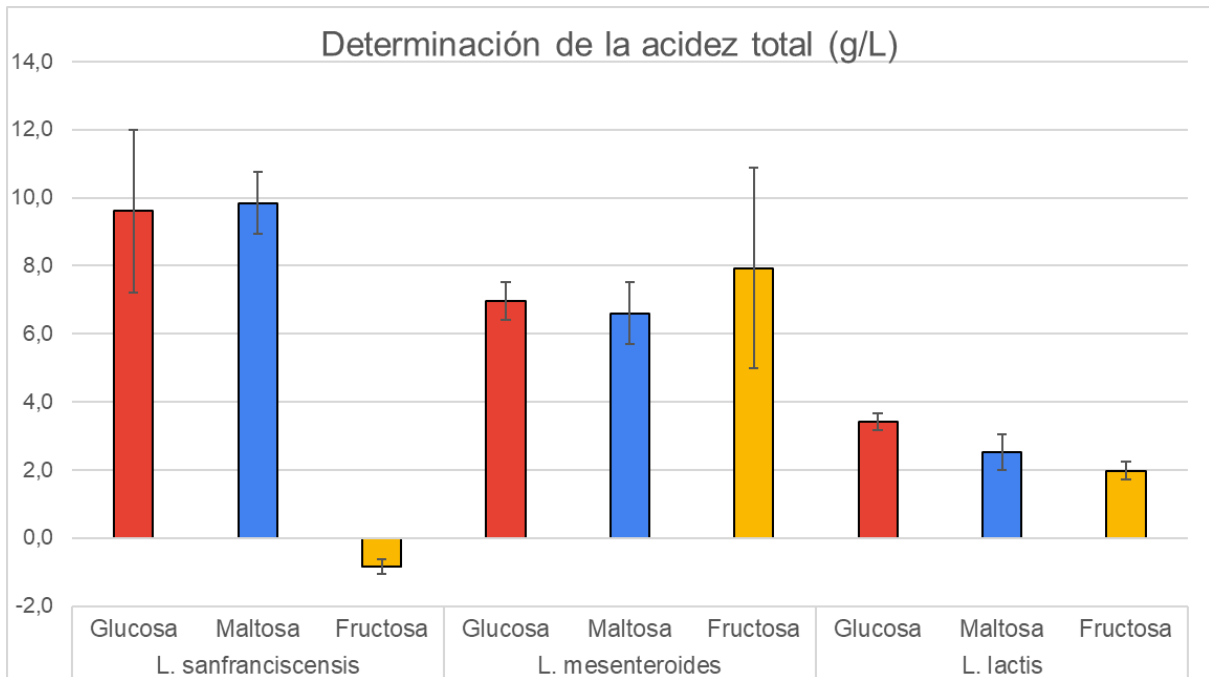


Figura 17. Determinación de la acidez total mediante titulación ácido-base. Valores calculados para equivalencia de ácido láctico (g/L).

Para determinar de forma más precisa los ácidos producidos por las bacterias lácticas durante la fermentación, se procedió a estudiar los contenidos de ácido L- y D- láctico y ácido acético en los microviales (ver Materiales y métodos apartado 6.6.) (Figura 18)

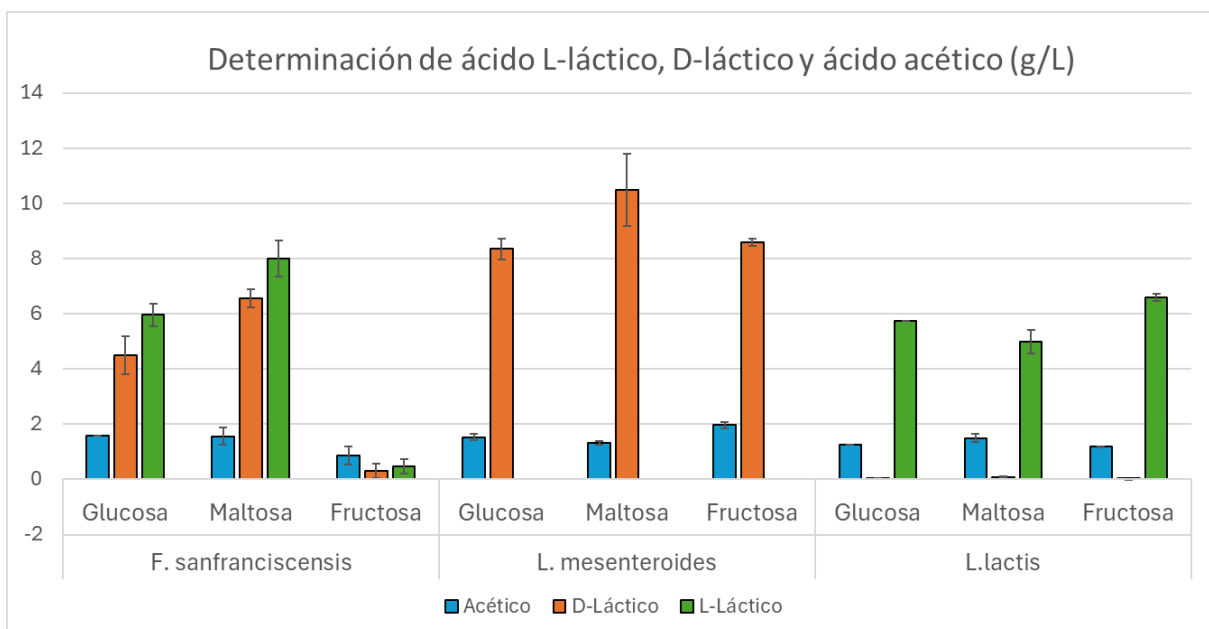


Figura 18. Determinación enzimática de ácido L-láctico, D-láctico y ácido acético.

Como puede apreciarse en la Figura 18, la producción de ácido acético no muestra gran diferencia entre las distintas especies estudiadas, tratándose de valores inferiores a 2 g/L en todos los casos.

En cuanto a la producción de ácidos D y L- Láctico, lo descrito en la literatura nos indica que *F. sanfranciscensis* tiene una producción considerable de ambos isómeros [77]. Por otra parte, *L. mesenteroides* solo produce D-láctico [78], mientras que *L. lactis* solo produce el isómero L del ácido láctico [79]. Esto fue efectivamente confirmado con los resultados obtenidos en este estudio.

La presencia de estos ácidos en las masas de panettone, especialmente en el 2º impasto, tiene una gran repercusión sobre las características sensoriales del producto. De esta forma, resulta interesante el estudio de la proporción de cada tipo de BAL, para saber en qué medida está presente cada uno de estos ácidos en el producto final. Una alta proporción de *Leuconostoc* supondría una elevada cantidad de ácido D-láctico, lo cual no es deseable debido a que este isómero puede ser perjudicial al metabolismo humano debido a la generación de acidosis y descalcificación [80, 81].

Con el fin de averiguar la cantidad y relación de bacterias presentes en las masas de panettone, actualmente se está realizando un estudio metagenómico en el Laboratorio de microbiología de la Escuela, que permitirá resolver esta cuestión.

7. Conclusiones

En este trabajo nos hemos propuesto profundizar en el conocimiento de la microbiota presente en masas de panettone (masa madre, primero y segundo impasto), y las conclusiones a las que hemos llegado son las siguientes:

1. Se han puesto a punto los medios de cultivo que nos han permitido aislar y hacer recuentos de las levaduras y bacterias lácticas presentes en las masas de panettone. De todos los ensayados el medio cromogénico CHROMagar Candida se ha elegido para el aislamiento de levaduras y el medio MRS5 para bacterias lácticas.
2. Se ha intentado sin éxito el aislamiento de bacterias acéticas a partir de las masas de panettone, probablemente debido a la ausencia o a su existencia minoritaria en dichas masas.

3. El recuento de levaduras en las tres masas estudiadas indica que la población de levaduras permanece constante mientras que la población de bacterias lácticas disminuye en el primer y segundo impasto.
4. Se ha realizado el aislamiento de levaduras y bacterias lácticas de las masas de panettone. Su caracterización molecular mediante PCR y secuenciación ha demostrado que la levadura predominante en las masas es *Kazachstania humilis* y como minoritaria *Saccharomyces cerevisiae*. En cuanto a las bacterias, al inicio hay una predominancia de la especie *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, que con el avance de la elaboración de panettone, se ve reemplazada por otras como *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus lactis*.
5. Se ha estudiado la capacidad fermentativa de las bacterias lácticas aisladas mediante microfermentaciones en viales confirmando que *L. lactis* realiza una fermentación homoláctica mientras que la de *F. sanfranciscensis* y *L. mesenteroides* es heteroláctica.
6. El estudio del crecimiento en medios con glucosa, fructosa y maltosa ha permitido conocer el metabolismo de estos azúcares llevado a cabo por las bacterias lácticas aisladas, demostrando que *F. sanfranciscensis* no utiliza y por tanto no fermenta fructosa.
7. La determinación de distintos ácidos producidos por las bacterias estudiadas ha permitido corroborar que *F. sanfranciscensis* produce L y D-láctico, y que los microorganismos *L. mesenteroides* y *L. lactis* producen únicamente D-láctico y L-láctico, respectivamente.

8. Referencias bibliográficas

1. Gänzle MG, Ehmann M, Hammes WP. Modeling of Growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in Response to Process Parameters of Sourdough Fermentation. Appl Environ Microbiol. 1998;64(7):2616-23.
2. Saavedra J, Valdiviezo L, Santa Cruz AY. Determinación de parámetros óptimos en la elaboración de panetón sustituido parcialmente con harina de banano (*Musa paradisiaca*). Ingeniería: Ciencia, Tecnología e Innovación. 2017;4(2). [Internet].

[citado 28 de junio de 2024]. Disponible en:
<https://revistas.uss.edu.pe/index.php/ING/article/view/717>

3. Meroth CB, Walter J, Hertel C, Brandt MJ, Hammes WP. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 2003a;69(1):475-82.
4. Catanzano G. Panettone re-volution: resiliencia della semplicità [Trabajo Fin de Grado]. [Italia]: Universidad de Padua; 2022.
5. Italianfood.net. Panettone is winning over consumers' taste worldwide. 2023. [Internet] [citado 28 de junio de 2024]. Disponible en:
<https://news.italianfood.net/2023/12/07/panettone-is-winning-over-consumers-taste-worldwide/>
6. Selyanina M. Panettone: El Dulce Viaje de Italia al Mundo [Internet]. PastryCampus - Escuela Online de Alta Pastelería. 2023 [citado 9 de junio de 2024]. Disponible en:
<https://www.pastrycampus.com/blog/panettone-el-dulce-viaje-de-italia-al-mundo/>
7. De Vero L, losca G, La China S, Licciardello F, Gullo M, Pulvirenti A. Yeasts and Lactic Acid Bacteria for Panettone Production: An Assessment of Candidate Strains. *Microorganisms.* 2021;9(5):1093.
8. Silveira A, Rodrigues M, Pavlak P, Canciam C. Elaboração e análise sensorial de «minipanettone» integral. *Universidade Tecnológica Federal do Paraná.* 2008;2(41).
9. Aquije García CF, Cisneros Pasco CI, Lavallo Ortiz MJ, Salazar Eneque IE, Servigón Echeverría ST. Diseño de Planta de Producción de pan a base de masa madre y harina de maíz morado. [Trabajo Fin de Grado]: Universidad de Piura (Perú). 2022 [citado 24 de junio de 2024]; Disponible en: <https://hdl.handle.net/11042/5395>
10. Vogel RF, Knorr R, Müller MR, Steudel U, Gänzle MG, Ehrmann MA. Non-dairy lactic fermentations: the cereal world. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1999;76(1-4):403-11.
11. Frazier WC, Westhoff DC. *Microbiología de los alimentos.* 4ª ed. Zaragoza: Acirbia; 1993. 82-84 p.
12. Randazzo CL, Heilig H, Restuccia C, Giudici P, Caggia C. Bacterial population in traditional sourdough evaluated by molecular methods. *J Appl Microbiol.* 2005;99(2):251-8.

13. Catzeddu P, Mura E, Parente E, Sanna M, Farris GA. Molecular characterization of lactic acid bacteria from sourdough breads produced in Sardinia (Italy) and multivariate statistical analyses of results. *Syst Appl Microbiol*. 2006;29(2):138-44.
14. Boraam F, Faid M, Larpent JP, Breton A. Lactic acid bacteria and yeast associated with traditional Moroccan sour-dough bread fermentation. *Sci aliments*. 1993;13(3):501-9.
15. Gobbetti M, De Angelis M, Di Cagno R, Calasso M, Archetti G, Rizzello CG. Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2019;302:103-13.
16. Marqués CB, Albiñana ML, Lacueva CP. La masa madre: el secreto del pan. *Alimentaria*. 2007;380:51.
17. Teffri-Chambelland T. Panettone y Bollería de Masa Madre [Internet]. *Bread Éditions*; 2021. p. 31-47, 75-92.
18. De Vuyst L, Neysens P. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*. 2005;16(1-3):43-56.
19. De Vuyst L, Harth H, Van Kerrebroeck S, Leroy F. Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *Int J Food Microbiol*. 2016;239:26-34.
20. Bidino RD, Galasso L. Laboratorio di panificazione: I pani laziali e ciociari. Museo della Civiltà Contadina e dell Ulivo. 2012.
21. Gómez J. Microbiota de las masas madre. [Trabajo Fin de Grado]: Universidad de Zaragoza (España). 2021.
22. Huys G, Daniel HM, De Vuyst L. Taxonomy and Biodiversity of Sourdough Yeasts and Lactic Acid Bacteria. *Handbook on Sourdough Biotechnology*. 2012;105-54.
23. Cortés AC. Impacto de la microbiota en las características de panes elaborados con masa madre [Trabajo Fin de Grado]. Universidad de Zaragoza (España); 2016.
24. Pulvirenti A, Berselli D. Studio del volatiloma negli impasti acidi durante la produzione del panettone artigianale [Trabajo Fin de Grado]: Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia (Italia); 2021.
25. Viiard E, Bessmeltseva M, Simm J, Talve T, Aaspõllu A, Paalme T, et al. Diversity and Stability of Lactic Acid Bacteria in Rye Sourdoughs of Four Bakeries with Different Propagation Parameters. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148325.

26. Van Kerrebroeck S, Maes D, De Vuyst L. Sourdoughs as a function of their species diversity and process conditions, a meta-analysis. *Trends in Food Science & Technology*. 2017;68:152-9.
27. Ewuoso MO, Animashaun OH, Adejumo AA. Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Spontaneously Fermented Sorghum Sourdough. *American Journal of Microbiological Research*. 2020;8(2):63-72.
28. Rivero L del V. Selección de bacterias lácticas autóctonas para su potencial aplicación en la conservación de alimentos de origen vegetal mínimamente procesados. 29 de abril de 2019 [citado 25 de junio de 2024]; Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/79215>
29. Bernal A, Padilla JA. Efecto de exopolisacáridos de *Lactobacillus reuteri* en la elaboración de masa madre con harina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) variedad blanca "salcedo inia" y roja "pasankalla" para la obtención de pan ácido libre de gluten. [Trabajo Fin de Grado]: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa (Perú). 2014.
30. Gobbetti M, Corsetti A. *Lactobacillus sanfrancisco* key sourdough lactic acid bacterium: a review. *Food Microbiology*. 1997;14(2):175-87.
31. Galli A, Ottogalli G. Aspetti della microflora degli impasti per panettone. *Ann Microbiol Enzimol*. 1973;23:39-49.
32. Galli A, Franzetti L, Fortina MG. Isolation and identification of sourdough microflora. *Microb Aliment Nutr*. 1988;6:345-51.
33. Foschino R, Gallina S, Andrighetto C, Rossetti L, Galli A. Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation of yeasts from sourdoughs for Italian sweet baked products. *FEMS Yeast Research*. 2004;4(6):609-18.
34. Garofalo C, Silvestri G, Aquilanti L, Clementi F. PCR-DGGE analysis of lactic acid bacteria and yeast dynamics during the production processes of three varieties of Panettone. *Journal of Applied Microbiology*. 2008;105(1):243-54.
35. Comecta [Internet]. HOMOGENEIZADOR "STOMACHER-400 CIRCULATOR" PARA MUESTRAS DESDE 80 HASTA 400 ML [citado 26 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.comecta.es/model/81>
36. CHROMagar™ Candida [Internet]. Chromagar. [citado 28 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.chromagar.com/es/product/chromagar-candida/>

37. Tornai-Lehoczki J, Péter G, Dlačhy D. CHROMagar Candida medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;86(1):189-200.
38. Gerard LM. Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de frutas [Internet]. [Tesis doctoral]: Universitat Politècnica de València (España). 2015 [citado 28 de junio de 2024]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/59401>
39. Castellucci. Análisis microbiológico del vino y del mosto. En: OIV/OENO (Asamblea General de la OIV). 2010.
40. Bravo-Ferrada BM, Hollmann A, Brizuela N, La Hens DV, Tymczynsyn E, Semorile L. Growth and consumption of l-malic acid in wine-like medium by acclimated and non-acclimated cultures of Patagonian *Oenococcus oeni* strains. *Folia Microbiol*. 2016;61(5):365-73.
41. Álvarez I. Estudio y optimización de medios de cultivo para el crecimiento de *Oenococcus oeni* [Trabajo Fin de Grado]: Universidad de Valladolid (España); 2017.
42. Çakır E, Arıcı M, Durak MZ. Biodiversity and techno-functional properties of lactic acid bacteria in fermented hull-less barley sourdough. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2020;130(5):450-6.
43. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, et al. Identification of Medically Important Yeasts Using PCR-Based Detection of DNA Sequence Polymorphisms in the Internal Transcribed Spacer 2 Region of the rRNA Genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(6):2302-10.
44. Khodadadi H, Karimi L, Jalalizand N, Adin H, Mirhendi H. Utilization of size polymorphism in ITS1 and ITS2 regions for identification of pathogenic yeast species. *Journal of Medical Microbiology*. 2017;66(2):126-33.
45. He Z, Wang J, Hu J, Zhang H, Cai C, Shen J, et al. Improved PCR primers to amplify 16S rRNA genes from NC10 bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(11):5099-108.
46. May-Torruco AL, Corona-Cruz AI, Luna Jiménez AL, Cortés NG, Vera RJ. Sensibilidad y Resistencia a Antibióticos de Cepas Probióticas Empleadas en Productos Comerciales. *ESJ* [Internet]. 2020;16(18). [citado 26 de mayo de 2024]. Disponible en: <http://eujournal.org/index.php/esj/article/view/13061>

47. Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*. 2008;12(3):227-32.
48. Carbonetto B, Nidelet T, Guezenec S, Perez M, Segond D, Sicard D. Interactions between *Kazachstania humilis* yeast species and lactic acid bacteria in sourdough. *Microorganisms*. 2020;8(2):240.
49. Lhomme E, Orain S, Courcoux P, Onno B, Dousset X. The predominance of *Lactobacillus sanfranciscensis* in French organic sourdoughs and its impact on related bread characteristics. *International Journal of Food Microbiology*. 2015;213:40-8.
50. Portales Pino S. Estudio de la calidad microbiológica de panes de distintos orígenes [Internet]. [Trabajo Fin de Grado]: Universidad de Valladolid (España); 2021 [citado 26 de junio de 2024]. Disponible en: <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/49306>
51. Lancetti RP. Desarrollo de masas madre y evaluación de propiedades reológicas y tecnológicas de panificados. [Internet] [Trabajo Fin de Grado]: Universidad Nacional de Córdoba (Argentina); 2017 [citado 26 de junio de 2024]. Disponible en: <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/5467>
52. Gobbetti M, Corsetti A, Rossi J. The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1994;41(4):456-60.
53. Meroth CB, Hammes WP, Hertel C. Identification and Population Dynamics of Yeasts in Sourdough Fermentation Processes by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*. 2003b;69(12):7453-61.
54. Torres FR. Estudio de interacciones bacterias ácido lácticas- levaduras en una fermentación para la elaboración de una bebida alcohólica [Internet] [Trabajo Fin de Grado]: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño (México). 2017 [citado 21 de junio de 2024]. Disponible en: <http://www.mundonano.unam.mx/ojs/index.php/nano/article/view/58159>
55. Brandt MJ. Industrial production of sourdoughs for the baking branch – An overview. *International Journal of Food Microbiology*. 2019;302:3-7.
56. Lattanzi A, Minervini F, Di Cagno R, Diviccaro A, Antonielli L, Cardinali G, et al. The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional Italian sweet leavened baked goods. *International Journal of Food Microbiology*. 2013;163(2):71-9.

57. Minervini F, Di Cagno R, Lattanzi A, De Angelis M, Antonielli L, Cardinali G, et al. Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: Interactions between ingredients and microbial species diversity. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78(4):1251-64.
58. Scheirlinck I, Van der Meulen R, Van Schoor A, Vancanney M, De Vuyst L, Vandamme P, et al. Taxonomic Structure and Stability of the Bacterial Community in Belgian Sourdough Ecosystems as Assessed by Culture and Population Fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2008 [citado 28 de junio de 2024];74. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.02771-07>
59. Vogel RD, Pavlovic M, Ehrmann MA, Wiezer A, Liesegang H, Offschanka S, et al. Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as stable element in traditional sourdoughs. *Microbial Cell Factories*. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2011;10(S6). Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1186/1475-2859-10-s1-s6>
60. Ruppitsch W, Nisic A, Hyden P, Cabal A, Sucher J, Stöger A, et al. Genetic Diversity of *Leuconostoc mesenteroides* Isolates from Traditional Montenegrin Brine Cheese. *Microorganisms*. 2021;9(8):1612.
61. Almendárez BG, Martin SE, C R. Bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos tradicionales mexicanos con potencial de utilización como antimicrobianos. *Microbiología*. 2006;48(3-4):260-8.
62. Todorov SD, Dicks LMT. Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2004;31(7):323-9.
63. Tieking M, Gänzle MG. Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends in Food Science & Technology*. 2005;16(1):79-84.
64. Akbar A, Sadiq MB, Imran A, Anwar M, Niaz M, Javed M, et al. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislada de productos lácteos fermentados y su potencial antimicrobiano. *CyTA: Journal of food*. 2019;17(1):214-20.
65. Vinderola G. Bacterias probióticas en productos lácteos fermentados. *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Buenos Aires*. 2014;66.
66. Vary P. Development of genetic engineering in *Bacillus megaterium*. *Biotechnology*. 1992;22:251-310.

67. Vary PS. Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology*. 1994;140(5):1001-13.
68. Pacher N, Burtscher J, Johler S, Etter D, Bender D, Fieseler L, et al. Ropiness in Bread—A Re-Emerging Spoilage Phenomenon. *Foods*. 2022;11(19):3021.
69. Díaz Monroy BL, Iglesias AE, Valiño E. Consorcios microbianos con actividad ácido-láctica promisorios aislados desde inoculantes bacterianos nativos para ensilajes. *Revista Ciencia y Agricultura*. 2014;11(1):17-25.
70. Olmos AR, Nacchio BL, Garro OA, Garro MS. Efecto de adición de azúcares y presencia de oxígeno sobre el metabolismo de bacterias lácticas: soja y medio de cultivo. *Ciencia Interior-Rev Cienc Básicas Apl*. 2023;1(1):14-14.
71. Zaunmüller T, Eichert M, Richter H, Uden G. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;72(3):421-9.
72. Rogalski E, Ehrmann MA, Vogel RF. Strain-specific interaction of *Fructilactobacillus sanfranciscensis* with yeasts in the sourdough fermentation. *Eur Food Res Technol*. 2021;247(6):1437-47.
73. Korakli M, Pavlovic M, Gänzle MG, Vogel RF. Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(4):2073-9.
74. Sánchez Adriá IE. Isolation, characterization and adaptive laboratory evolution of baker's yeasts [Internet]. [Trabajo Fin de Grado]: Universidad de Valencia (España). 2024 [citado 23 de junio de 2024]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/10550/96851>
75. Marcén Terraza M, Mañas Pérez P, Condón Usón S. Influencia del estrés oxidativo en la inactivación bacteriana por diferentes tecnologías utilizadas para la conservación de los alimentos. [Tesis] Universidad de Zaragoza (España), Prensas de la Universidad. 2018.
76. He X, Yu Y, Kemperman R, Jimenez L, Ahmed Sadiq F, Zhang G. Comparative genomics reveals genetic diversity and variation in metabolic traits in *Fructilactobacillus sanfranciscensis* strains. *Microorganisms*. 2024;12(5):845.
77. De Angelis M, Di Cagno R, Gallo G, Curci M, Siragusa S, Crecchio C, et al. Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*. 2007;114(1):69-82.

78. Li L, Eom HJ, Park JM, Seo E, Ahn JE, Kim TJ, et al. Characterization of the major dehydrogenase related to d-lactic acid synthesis in *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293. *Enzyme and Microbial Technology*. 2012;51(5):274-9.
79. Petrov K, Urshev Z, Petrova P. l(+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84. *Food Microbiology*. 1 de junio de 2008;25(4):550-7.
80. Petersen C. D-Lactic Acidosis. *Nutrition in Clinical Practice*. 2005;20(6):634-45.
81. Nanfra S, Logrippo A, Ortubia C. Producción de ácido láctico por la vía biotecnológica [Internet]. [Trabajo Fin de Grado]: Universidad Juan Agutín Maza (Argentina). 2021 [citado 27 de junio de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.umaza.edu.ar/handle/00261/2739>