

Caracterización microbiana de masa madre de una industria local

Moisés López López (mloplop1@alu.upo.es), Belén Floriano.

Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica. Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide, ctra. Utrera Km 1, 41013 Sevilla (España)

Introducción:

La masa madre panadera es el producto de la fermentación por parte de levaduras y de bacterias ácido-lácticas (BAL) de una masa de agua y harina. Dependiendo del origen del inóculo microbiano, las masas madre se pueden clasificar en tres tipos (1). Las de tipo 1 se originan por fermentación espontánea y re-alimentación (backslopping). Las de tipo 2 son fermentadas por un cultivo iniciador añadido. Las de tipo 3 son inoculadas con un cultivo iniciador y se mantienen por backslopping.

Las propiedades de los productos de masa madre, como su mayor resistencia a la descomposición por mohos, su sabor y aromas, se han atribuido a la presencia de bacterias lácticas y al metabolismo de estas (2). En este estudio se hace una caracterización de las bacterias presentes en dos muestras de una masa madre industrial. También se detecta la capacidad antimicrobiana de dichas bacterias.

Resultados:

-Determinación de la concentración de bacterias lácticas:

Dos muestras de masa madre, tomadas en momentos distintos (noviembre 2019 -muestra A- y enero 2020 -muestra B-), fueron homogeneizadas con un Stomacher con una dilución 1/10 en agua de peptona. Diluciones de 10^4 a 10^7 de este homogeneizado se sembraron en medio mMRS suplementado con cicloheximida, cultivándose a 30°C . La concentración de bacterias obtenida fue de $2,65 \pm 0,5 \cdot 10^7$ UFC/g para la muestra A y de $3,97 \pm 0,6 \cdot 10^7$ UFC/g para la muestra B.

-Caracterización morfológica de los aislados:

Se seleccionaron 50 candidatos de cada muestra a los que se les realizó la prueba de la catalasa. Los candidatos catalasa negativo fueron clasificados por su morfología al microscopio óptico. Se han detectado tres morfologías predominantes: bacilos cortos, intermedios y largos (Figura 1).

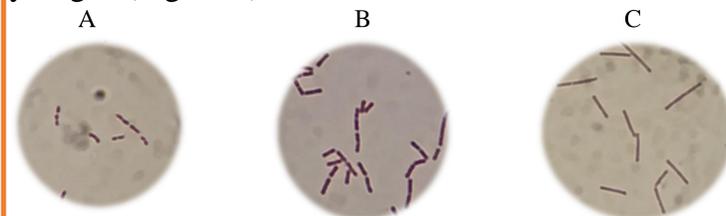


Fig 1 Fotografías tomadas de tinciones Gram de los candidatos P8 (A, bacilos cortos), G12 (B, bacilos intermedios) y G8 (C, bacilos largos) de la muestra A al microscopio óptico con 1000 aumentos.

Las proporciones de estas morfologías en cada muestra de masa madre, provenientes de la misma fábrica, tipo de harina, condiciones y destinadas al mismo tipo de producto son distintas entre ellas (Figuras 2 A y 2 B). Esto puede deberse a que las masas madres estaban en distinto momento de la fermentación.

-Caracterización molecular de los aislados:

El ADN de las bacterias candidatas se extrajo usando guanidina y gel de silica (3). Se amplificó por PCR un fragmento de 500 pb del gen del ARNr 16s con los oligonucleótidos F27 y R519(4). Estos fragmentos se secuenciaron y se compararon con bases de datos usando la opción Megablast de la herramienta Blastn (5). Se detectaron como especies predominantes en la muestra A: *Lactobacillus crustorum* (morfología de bacilo largo), *Lactobacillus plantarum* (bacilo medio) *Lactobacillus rossiae* (bacilo corto).

- Detección de actividad antimicrobiana.

Se utilizaron como cepas indicadoras de esta actividad estirpes inocuas de *Listeria innocua* y *Staphylococcus aureus*. Los candidatos provenientes de las muestras de masa madre se cultivaron en agar BHI y en PCA y se les añadió un césped microbiano de cada cepa. Se consideraron resultados positivos la presencia de halos de inhibición en torno a las colonias. En este estudio se analizaron 53 candidatos de la muestra A y 39 de la muestra B.

Las pruebas con la muestra A se realizaron en los medios BHI y PCA. No se detectó actividad antimicrobiana frente a *L. innocua* en BHI mientras que en PCA 6 candidatos (G3, G12, G23, P4, P25 y P28) fueron seleccionados como positivos. Frente a *S. aureus*, se encontró actividad en un candidato en BHI (G27) mientras que en PCA se encontró en P25 y en P28. En las pruebas con la muestra B se usó solo medio BHI. Ningún candidato presentó actividad contra *L. innocua*. Sin embargo, dos candidatos (1 y 2) la presentaron contra *S. aureus*.

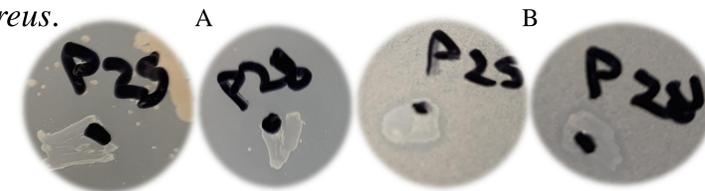


Figura 3: Ejemplo de halo de inhibición frente *L.innocua* (par A) y *S.aureus* (par B) en PCA de los candidatos P25 y P28.

Conclusiones:

- 1-La concentración de bacterias en las muestras analizadas fue similar a la descrita en la bibliografía (6).
- 2-Las especies identificadas más frecuentemente en la primera muestra de masa madre fueron *Lb. crustorum*, *Lb. rossiae* y *Lb. plantarum*. La dominancia de *Lb. plantarum* es algo común en las masas madre, mientras que *Lb. rossiae* y *Lb. crustorum* aparecen en menor grado (6).
- 3-Se estableció una correlación entre la morfología celular y la especie identificada.
- 4-La proporción de cada morfología celular predominante en las dos muestras de masa madre analizadas fue diferente lo que podría relacionarse con un diferente estado de maduración de la misma.
- 5-La actividad antimicrobiana de las BAL depende de la composición del medio de cultivo.

Referencias:

- 1-De Vuyst L., Van Kerrebroeck S. and Leroy F. (2017) Microbial Ecology and Process Technology of Sourdough Fermentation. *Advances in Applied Microbiology* 100:49-160.
- 2-Sadeghi A. (2008) The secrets of sourdough: a review of miraculous potentials of sourdough in bread shelf life. *Biotechnology* 7(3):413-417. ISSN 1682-296X.
- 3-<https://dnabarcoding101.org/lab/protocol-2.html#standard>.
- 4-Inmaculada García Romero. Análisis del genoma de *Sphingopyxis granuli* estirpe TFA y caracterización de un nuevo elemento regulador de los genes de degradación de tetralina. Universidad Pablo de Olavide, 2017.
- 5-Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T.L., Agarwala R., & Schäffer A.A. (2008) "Database indexing for production MegaBLAST searches." *Bioinformatics* 15:1757-1764.
6. Ilse Scheirlinck, Roel Van der Meulen, Ann Van Schoor, Marc Vancanneyt, Luc De Vuyst, Peter Vandamme and Geert Huys. Influence of Geographical Origin and Flour Type on Diversity of Lactic Acid Bacteria in Traditional Belgian Sourdoughs. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Oct. 2007, p. 6262-6269