

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## ***DISEÑO DE PAN CON MASA MADRE Y MICROALGAS***

TRABAJO FIN DE GRADO EN  
CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: IRENE FERNAN LARA MARTÍNEZ

TUTORA: PURIFICACIÓN GARCIA SEGOVIA

COTUTORA: M<sup>a</sup> JESÚS PAGÁN MORENO

*Curso Académico 2014/2015*

VALENCIA, MAYO DEL 2015



## **TÍTULO: DISEÑO DE PAN CON MASA MADRE Y MICROALGAS.**

### **RESUMEN:**

El pan es un alimento de gran consumo en la población española, donde cada vez es mayor la demanda de diferentes variedades de éste, que además consigan aportar beneficios nutritivos extra a la salud. Es por lo que se pensó en el presente trabajo, que tiene como objeto la formulación, elaboración y posterior valoración de 4 panes confeccionados a partir de 4 masas madres a la que se les incorporan un 1.5% de 4 especies de microalgas distintas a cada una de ellas: *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Scenedesmus almeriensis* y *Nannochloropsis gaditana*.

Las microalgas tienen grandes cantidades de compuestos muy beneficiosos para la salud que no se consiguen encontrar en otro tipo de alimento de origen vegetal. Muchas especies han sido aprobadas en la legislación de Novel Foods, por lo que se revalorizan y ofrecen como alternativa frente a su uso como biocombustible o piensos para alimentación animal.

Los resultados obtenidos de análisis de color, viscosidad y microbiológicos para la masa madre, y de color, textura y sensoriales para el pan; ponen de manifiesto que la masa madre presenta una coloración diferente a los panes normales y viscosidades mayores. Además de un crecimiento mayor en cuanto se refiere a las bacterias lácticas encargadas de la fermentación. Los panes horneados a partir de éstas masas madres resultan con valores muy similares en las propiedades básicas de calidad del pan normal, excepto para el color, que difiere significativamente. Al evaluar los panes sensorialmente se observa una posible aceptación en el mercado, al ser todos ellos muy bien valorados.

**Palabras clave:** pan, masa madre, microalgas, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Scenedesmus almeriensis*, *Nannochloropsis gaditana*, microbiología, color, viscosidad, textura y sensorial.

**Autora:** IRENE FERNAN LARA MARTÍNEZ

**Tutora académica:** PURIFICACIÓN GARCIA SEGOVIA

**Cotutora:** M<sup>a</sup> JESÚS PAGÁN MORENO

**TITLE: DESIGN OF BREAD WITH SOURDOUGH AND MICROALGAE.**

**ABSTRACT:**

Bread is a food with high consumption in the Spanish population. Demand of different varieties of it is increasing, moreover it has to provide extra health nutritional benefits.

For this reason this paper aims to the formulation, preparation and subsequent rating of 4 breads made from 4 sourdough which were incorporated 1.5% of 4 different species of microalgae to each of them: *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Scenedesmus almeriensis* and *Nannochloropsis gaditana*.

Microalgae have very large amounts of beneficial compounds to health that they cannot find in other foods of plant origin. Many species have been adopted in the legislation of Novel Foods, which was revalued and offer as an alternative to its use as biofuel or feed.

Results of color, viscosity and microbiological analysis for the sourdough, and color, texture and sensory for bread show that the sourdough has a different coloration than normal bread and higher viscosities. In addition, lactic acid bacteria responsible for fermentation have more growth than normal bread. The breads baked from these sourdoughs have similar values in the basic properties of regular bread quality, except for the color, which differs significantly. When the bread was evaluated sensory, they show a possible acceptance in the market, and all of them were highly valued.

**Keywords:** bread, sourdough, microalgae, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Scenedesmus almeriensis*, *Nannochloropsis gaditana*, microbiology, color, viscosity, texture and sensory analysis.

**Authoress:** IRENE FERNAN LARA MARTÍNEZ

**Academic tutor:** PURIFICACIÓN GARCIA SEGOVIA

**Cotutor:** M<sup>a</sup> JESÚS PAGÁN MORENO

*Agradecer a mis tutores Puri, Chus y Javi, además del equipo de Food Design,  
por el apoyo profesional y personal, sin el que este proyecto no hubiera sido posible.*

*Como no, a Jesús Machí, por su experiencia profesional  
y por confiar plenamente en este proyecto.*

*A mis padres, mis abuelos, mi hermano y a mi cuñada  
por todo el apoyo y ánimo que me han dado durante la carrera y el proyecto.*

*Y a Javi por estar a mi lado para todo.*

*Por último, a todas las personas que han estado siempre  
y las que han pasado por mi vida estos últimos 4 años,  
las cuales de una manera u otra me han hecho aprender mucho.*

## Índice

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	Pan.....	1
1.1.1.	Historia del pan .....	1
1.1.2.	Definición de pan y panes especiales.....	1
1.1.3.	Mercado del pan .....	2
1.2.	Microalgas .....	3
1.2.1.	Definición e historia .....	3
1.2.2.	Beneficios y composición .....	4
1.2.3.	Especies de microalgas utilizadas.....	8
1.3.	Pan junto con microalgas .....	12
1.3.1.	Jesús Machí .....	14
2.	OBJETIVOS .....	15
2.1.	Objetivo general.....	15
2.2.	Objetivos específicos.....	15
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1.	Plan de trabajo .....	16
3.2.	Materias primas e ingredientes .....	17
3.3.	Proceso de elaboración.....	18
3.4.	Análisis físico-químico .....	20
3.4.1.	Actividad de agua .....	20
3.4.2.	Humedad .....	20
3.4.3.	Color .....	21
3.4.4.	pH .....	21
3.4.5.	Acidez .....	21
3.4.6.	Viscosidad.....	21
3.4.7.	Textura .....	22
3.4.8.	Tamaño de alveolo .....	22
3.5.	Análisis microbiológico.....	23
3.6.	Análisis sensorial .....	23
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....	24
4.1.	Análisis de las masas .....	24
4.1.1.	Actividad de agua, Humedad y pH .....	24
4.1.2.	Color .....	25
4.1.3.	Viscosidad.....	27

4.1.4.	Microbiología .....	28
4.2.	Análisis del pan.....	30
4.2.1.	Actividad de agua, Humedad, pH y Acidez.....	31
4.2.2.	Color .....	32
4.2.3.	Textura .....	34
4.2.4.	Estudio de imagen del alveolo .....	35
4.2.5.	Sensorial .....	36
5.	CONCLUSIONES .....	38
6.	BIBLIOGRAFIA .....	39

## Índice de tablas

**Tabla 1.-** Composición química de las especies de microalgas utilizadas.

**Tabla 2.-** Pruebas preliminares.

**Tabla 3.-** Formulaciones estudiadas.

**Tabla 4.-** Resultados de aw, humedad y pH para las diferentes formulaciones de masa madre.

**Tabla 5.-** Resultados de coordenadas y atributos de color de las diferentes formulaciones de masa madre estudiadas.

**Tabla 6.-** Resultados del estudio de la viscosidad con las diferentes formulaciones de masa madre.

**Tabla 7.-** Resultados del recuento en placa de los microorganismos presentes en las diferentes formulaciones de masa madre.

**Tabla 8.-** Resultados de aw, humedad, pH y grado de acidez para las diferentes formulaciones de panes estudiados.

**Tabla 9.-** Resultados de coordenadas y atributos de color para la corteza de los diferentes panes estudiados.

**Tabla 10.-** Resultados de coordenadas y atributos de color para la miga de los diferentes panes estudiados.

**Tabla 11.-** Resultados de parámetros de textura de la corteza en las formulaciones de pan.

**Tabla 12.-** Resultados de parámetros de textura de la miga en las formulaciones de pan.

**Tabla 13.-** Resultados de la porosidad evaluada para las formulaciones de pan.

**Tabla 14.-** Resultados de cada atributo sensorial para las diferentes formulaciones de pan.

## Índice de figuras

**Figura 1.-** Estructura química de la clorofila a y b.

**Figura 2.-** Estructura química de a) licopeno, b) betacaroteno, c) astaxantina, d) luteína, e) cantaxantina.

**Figura 3.-** Estructura química de algunos ácidos grasos poliinsaturados.

**Figura 4.-** Visión general de los productos sintetizados por las microalgas y sus áreas de aplicación.

**Figura 5.-** Imagen al microscopio (zoom x10 y x40) de la especie *Isochrysis galabana*.

**Figura 6.-** Imagen al microscopio (zoom x10 y x40) de la especie *Tetraselmis suecica*.

**Figura 7.-** Imagen al microscopio (zoom x10 y x40) de la especie *Scenedesmus almeriensis*.

**Figura 8.-** Imagen al microscopio (zoom x10 y x40) de la especie *Nannochoreopsis gadityna*.

**Figura 9.-** Galletas con microalgas (izquierda: *Chlorella*; derecha: *Isochrysis*).

**Figura 10.-** Pasta con *Isochrysis*.

**Figura 11.-** Diagrama de flujo de elaboración del pan para el presente trabajo.

**Figura 12.-** Imagen de las áreas (marcadas con amarillo) de la rodaja de pan sin tener en cuenta los alveolos (izquierda) y de la rodaja de pan total (derecha).

**Figura 13.-** Representación del plano  $C^*$  vs  $L^*$  (izquierda) y en el plano  $a^*$  vs  $b^*$  (derecha) de las masas madres en base a los resultados.

**Figura 14.-** Gráfica de barras que representa el crecimiento de los aeróbios mesófilos (izquierda) y bacterias lácticas (derecha) en cada tipo de masa madre.

**Figura 15.-** Gráfica de barras que representa el crecimiento de mohos y levaduras en cada tipo de masa madre.

**Figura 16.-** Representación del plano  $C^*$  vs  $L^*$  (izquierda) y en el plano  $a^*$  vs  $b^*$  (derecha) de los panes en base a los resultados.

**Figura 17.-** Puntuaciones de la cata de los distintos atributos sensoriales para las cuatro formulaciones elaboradas de pan con microalgas.



## Abreviaturas empleadas a lo largo de la memoria:

ISO: Referida a la especie de microalga *Isochrysis galbana*.

TETRA: Referida a la especie de microalga *Tetraselmis suecica*.

SA: Referida a la especie de microalga *Scenedesmus almeriensis*.

NANNO: Referida a la especie de microalga *Nannochloropsis gaditana*.

RTS: Reglamentación Técnico-Sanitaria.

BOE: Boletín Oficial del Estado.

μm: Micro metros.

aw: Actividad de agua.

rpm: Revoluciones por minuto.

cP: CentiPoise.

N: Newton.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

# Capítulo 1. Introducción

# 1. INTRODUCCIÓN

Cada vez se encuentra más variedad a la hora de adquirir, y por tanto consumir, pan en la dieta. La demanda de productos diferentes, innovadores, fáciles de obtener en cualquier superficie de venta al consumidor y además, con beneficios para la salud, se está convirtiendo en una de las premisas más importantes para la población. Es por ello, que se pensó en la realización de este proyecto de diseño de una nueva variedad de pan especial con incorporación de microalgas, con grandes beneficios para la salud, a la masa madre con la que se ha desarrollado el producto que se presenta en este trabajo. Algunas especies de microalgas están aprobadas como suplementos nutricionales (*Spirulina* y *Chlorella*), otras son de reciente aprobación como Novel Food y muchas están siendo objeto de numerosas investigaciones para definir sus propiedades fisicoquímicas y su valor nutricional.

## 1.1. Pan

### 1.1.1. Historia del pan

A lo largo de la historia, el pan se ha ido elaborando con el cereal disponible en la zona o con la variante modificada más resistente. Es por ello que su historia corre paralela al uso de los cereales por parte del hombre. Éstos, por sí solos, no pueden ser digeridos por el aparato digestivo humano, por lo que deben de ser procesados artificialmente para poder incorporarse en nuestra dieta. Los primeros panes eran planos, debido a la facilidad de su elaboración, sin levadura en sus masas y cocinados en fuegos abiertos o superficies calientes. Más adelante se produjo un proceso de molienda y malteado, además del comienzo de la fermentación del pan, ya que con ello se conseguía un sabor más agradable (FECHIPAN, 2015).

Así pues, con el gran aporte de hidratos de carbono y fibra que presentan, empezaron a convertirse en alimentos básicos para el hombre, pudiendo haber sido uno de los primeros alimentos procesados en la historia de la humanidad junto con el aceite y el vino (FECHIPAN, 2015).

### 1.1.2. Definición de pan y panes especiales

Según la Reglamentación Técnico-Sanitaria (RTS) para la fabricación, circulación y comercio de pan y panes especiales del año 1984 y con última modificación el año 2014, se define el pan como el producto perecedero resultante de la cocción de una masa obtenida por la mezcla de harina de trigo, sal comestible y agua potable, fermentada por especies de microorganismos propias de la fermentación panaria, como el *Saccharomyces cerevisiae*.

El pan común es el definido anteriormente de consumo habitual en el día, elaborado con harina de trigo, que cumple los requisitos establecidos y al que solo se le pueden añadir los coadyuvantes tecnológicos y aditivos autorizados para este tipo de pan.

En el caso del pan diseñado para la elaboración de este proyecto, se especifica como pan especial al reunir dos de las condiciones que se encuentran citadas en la RTS que son:

- Por su composición, ya que se ha añadido cualquier ingrediente que se cita en el artículo 15 de la mencionada RTS y que elevan suficientemente su valor nutritivo. Este artículo, a su vez, define otro ingrediente como cualquier otra de las materias primas que se utilicen como ingredientes del pan debiendo cumplir obligatoriamente la correspondiente Reglamentación Técnico-Sanitaria que le afecte, y en su defecto, el Código Alimentario Español.
- Por su formato, ya que precisa de un procedimiento de elaboración y acabado no susceptible de mecanización en todas sus fases, por exigir la intervención de mano de obra en cada pieza individualizada.

Además, dentro del pan especial, en esta Reglamentación se encuentran diferentes denominaciones, que en el presente proyecto se corresponde con pan enriquecido, definido como aquel en cuya elaboración se ha incorporado harinas enriquecidas o en el que se han empleado sustancias enriquecedoras según lo dispuesto en la vigente Reglamentación Técnico-Sanitaria de Alimentos Enriquecidos.

### 1.1.3. Mercado del pan

Según el estudio sobre el consumo de pan en España realizado por Mercasa, basándose en las fuentes del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino de 2011, que son los últimos datos disponibles, el pan está entre las partidas más demandadas por los hogares españoles configurándose como el alimento con la frecuencia más elevada tanto de compra como de consumo.

En la actualidad, cada español consume al año cerca de 46 kilos de pan y gasta en este producto en torno a 116 euros, destacando especialmente la demanda en el hogar (80.9 % del consumo y 81.3% del gasto).

Teniendo en cuenta que los principales operadores del mercado del pan europeo son Alemania y Reino Unido, cada vez han aparecido más variedades de pan y otros productos de panadería en toda Europa durante los últimos años. Estas tendencias están relacionadas con la salud, la conveniencia, la sostenibilidad, la diversidad étnica o la sofisticación.

En el caso de España, las variedades más consumidas y conocidas son la barra, la baguette y el pan integral y con fibras. Pero su consumo depende de muchos factores como son: la edad, el sexo y el momento del día.

A la hora de la elección del establecimiento habitual de compra de pan, se tiene en cuenta la cercanía al hogar o lugar de trabajo, la confianza del vendedor y la calidad de los productos que ofrece; siendo el establecimiento donde se adquiere con mayor frecuencia el pan fresco en comercios especializados, como las panaderías, y el pan industrial en los supermercados, aunque cabe decir que a rasgos generales, el pan se canaliza fundamentalmente a través del comercio especializado.

Una vez elegido el establecimiento de compra, los consumidores tienen en cuenta los siguientes aspectos a valorar: la cocción, sabor y calidad.

Es por todo lo anteriormente mencionado en relación a la situación del pan en el mercado, que se consideró para la incorporación de las microalgas como ingrediente diferencial, un pan confeccionado con masa madre de elaboración tradicional. Para la comprensión del método de fabricación tradicional partiendo de masa madre, se contó con la ayuda del maestro panadero Jesús Machí (Horno San Bartolomé, Valencia).

## 1.2. Microalgas

### 1.2.1. Definición e historia

Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos microscópicos que se encuentran en una gran variedad de ambientes. Estos microorganismos son más eficientes a la hora de transformar la energía solar en biomasa que las plantas por una doble razón: su estructura celular es más sencilla y, además, se encuentran completamente sumergidas en un medio acuoso, conformando toda su superficie como un área de intercambio de nutrientes y CO<sub>2</sub> (De la Jara Valido et al., 2013).

Esto resulta en la generación de varios componentes celulares, energía y oxígeno molecular, por lo que las microalgas constituyen unos prometedores microorganismos biocatalizadores que incrementarán el campo de la "White Biotechnology" (Koller et al., 2014). La producción de microalgas es un importante mecanismo natural para reducir el exceso de CO<sub>2</sub> atmosférico por bio-fijación, asegurando la disminución del efecto invernadero, el calentamiento global y el cambio climático. Asimismo presentan un importante papel como alimentación para acuicultura y son capaces de eliminar nutrientes (o contaminantes) del agua, además de presentar gran potencial como fuente de producción de biodiesel (Gouveia et al., 2008).

Del mismo modo, las microalgas resultan válidas tanto como alimento para los animales y para el ser humano, como producto con fines químicos y como portadoras de energía verde dada su excepcional capacidad para la fijación de CO<sub>2</sub> que ilustra su indispensable significado como sustentadoras del ecosistema terrestre (Koller et al., 2014).

Teniendo en cuenta el marco histórico, la huella dactilar de algunas microalgas del grupo de las cianobacterias encontradas en rocas fosilizadas del oeste de Australia datan de hace 3.4 billones de años. Muchos estudios confirman que desde entonces hasta nuestros días su estructura permanece estable y, siguen representando una de las formas organizadas más complicadas y especializadas de vida. Sin embargo, otros artículos estiman que el tiempo actual de evolución de las microalgas cianobacterias es de hace 2.7 billones de años. Los biólogos evolutivos consideran que las algas podrían ser antecesores de las plantas, aunque éstos necesitan superar múltiples obstáculos para confirmar definitivamente estos argumentos completándose con más evidencias científicas. (Safi et al., 2014).

Sin embargo, el cultivo de microalgas data de hace solo unas pocas décadas y de entre las 30000 especies que se piensan que existen, solo unas pocas se cultivan en la actualidad por su interés industrial (combustible, alimentación animal y humana, cosmética...), otras se han utilizado solo en investigación para determinar la composición química y valor nutricional. Y el resto se conservan en colecciones de cultivo para mantener la biodiversidad (Gouveia et al., 2008).

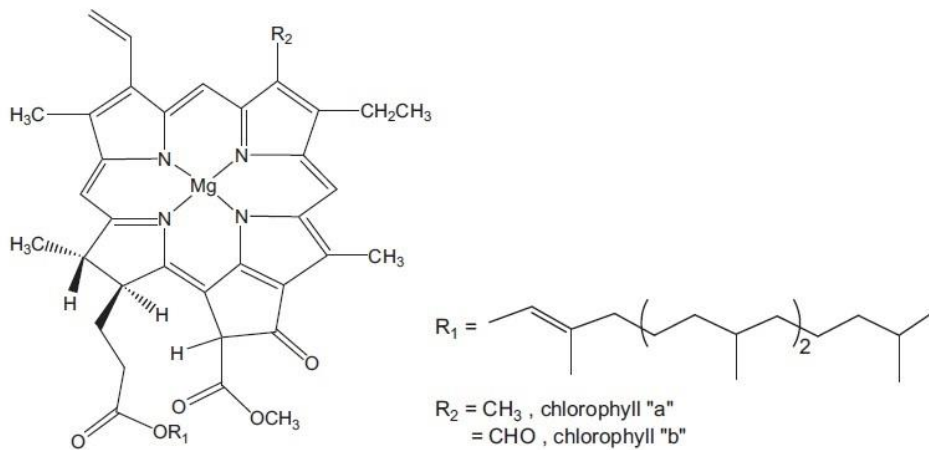
### 1.2.2. Beneficios y composición

La composición química de las microalgas no es constante ya que los factores medioambientales como la temperatura, salinidad, iluminación, pH, contenido mineral, CO<sub>2</sub>, densidad de población, fase de crecimiento y estado fisiológico, pueden modificarla notablemente. Estos cambios en las condiciones ecológicas pueden estimular o inhibir la biosíntesis de numerosos nutrientes, es por ello que la producción de biomasa, y por tanto biomoléculas de interés, dependerá de las determinadas situaciones de estrés o condiciones de crecimiento a las que estén expuestas (Gouveia et al., 2008; Batista et al., 2013; Koller et al., 2014).

Debido a su gran capacidad de adaptación a las nuevas condiciones medioambientales para poder sobrevivir a lo largo de los años, las microalgas producen una gran variedad de metabolitos biológicamente activos, con estructuras que no podemos encontrar en otros organismos (Batista et al., 2013; Koller et al., 2014; Gouveia et al., 2008).

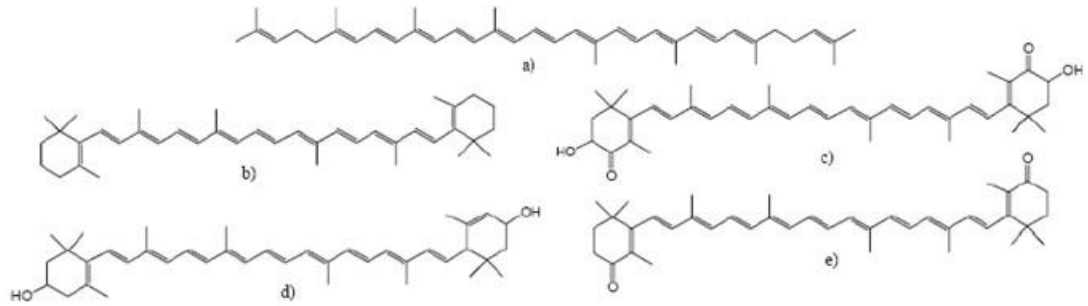
Los valiosos compuestos que podemos encontrar en las microalgas son:

- Pigmentos: Una de las características más importantes es su color y cada phylo de microalga combina cada uno de estos pigmentos de una determinada manera para obtener su color característico. Además de la clorofila, como el pigmento fotosintético primario, estos microorganismos poseen otros secundarios como las ficobiliproteínas o los carotenos, que son capaces de aumentar la eficiencia de utilización de la energía solar y las protegen contra los excesos de radiación solar y sus efectos relacionados (Gouveia et al., 2008).
  - o Clorofila (figura 1): A parte de ser colorantes alimentarios, los derivados de la clorofila pueden favorecer la salud con sus propiedades antiinflamatorias. Recientes estudios han evidenciado que su consumo disminuye el riesgo de cáncer colorectal (Gouveia et al., 2008).



**Figura 1.-** Estructura química de la clorofila a y b. Fuente: Gouveia et al., 2008.

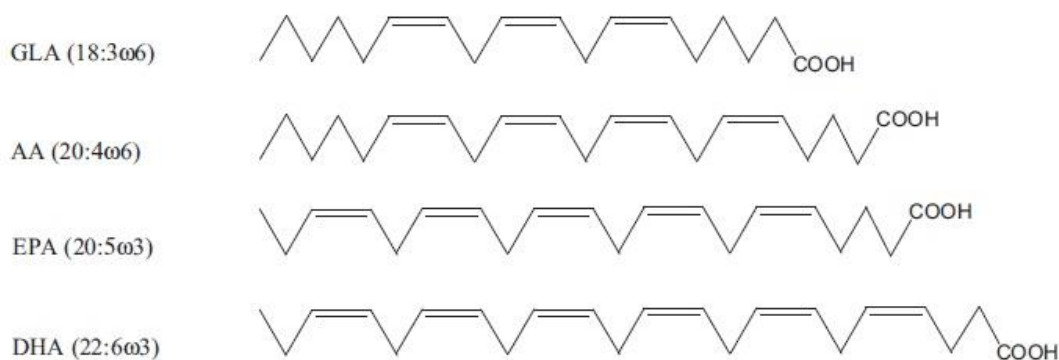
- o Carotenoides (figura 2): Responsables de los diferentes colores desde amarillo a rojo, funcionan como protectores de los rayos solares del aparato fotosintético. Los principales carotenoides que producen las microalgas son el betacaroteno y la astaxantina, además del licopeno y luteína, varios de los cuales con una elevada capacidad antioxidante que funcionan como provitamina A. Epidemiológicamente se ha correlacionado con una disminución del riesgo en enfermedades en la cuales los radicales libres juegan un rol en la iniciación, como la arteriosclerosis, enfermedades oculares, de la piel y cáncer (Gouveia et al., 2008; De la Jara et al., 2014).



**Figura 2.-** Estructura química de a) licopeno, b) betacaroteno, c) astaxantina, d) luteína, e) cantaxantina. Fuente: Gouveia et al., 2008.

- Ficobiliproteínas: pigmentos fluorescentes hidrosolubles, entre los cuales se encuentran la ficocianina y ficoeritrina, son utilizados como marcadores clínicos de diagnósticos y para el etiquetado de anticuerpos, además presentan propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, neuroprotectoras y hepatoprotectoras (Gouveia et al., 2008; De la Jara et al., 2013).
- Ácidos grasos: las microalgas son fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (figura 3), dentro de esta clasificación podemos encontrar los denominados omega 6 y omega 3. Estos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga no pueden ser sintetizados por las plantas ni por los animales, tampoco por el ser humano, por lo que debemos obtenerlos a partir de nuestra dieta.
  - Los omega 6 que presentan las microalgas son, entre otros, el linolénico (GLA) y el ácido araquidónico (ARA).
  - Los omega 3 son el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el docohexaenóico (DHA). La consumición de estos ácidos, sobretodo el DHA, ha sido asociada con la regulación de la producción de EPA, los cuales son sustancias biológicamente activas que influyen en varias funciones de las células y tejidos, siendo importantes en la profilaxis y terapia de enfermedades crónicas y degenerativas, como la reducción del colesterol en sangre y la prevención de enfermedades cardiovasculares, arteriosclerosis, enfermedades de la piel y artritis (De la Jara et al., 2013; De la Jara et al., 2014; Gouveia et al., 2008).



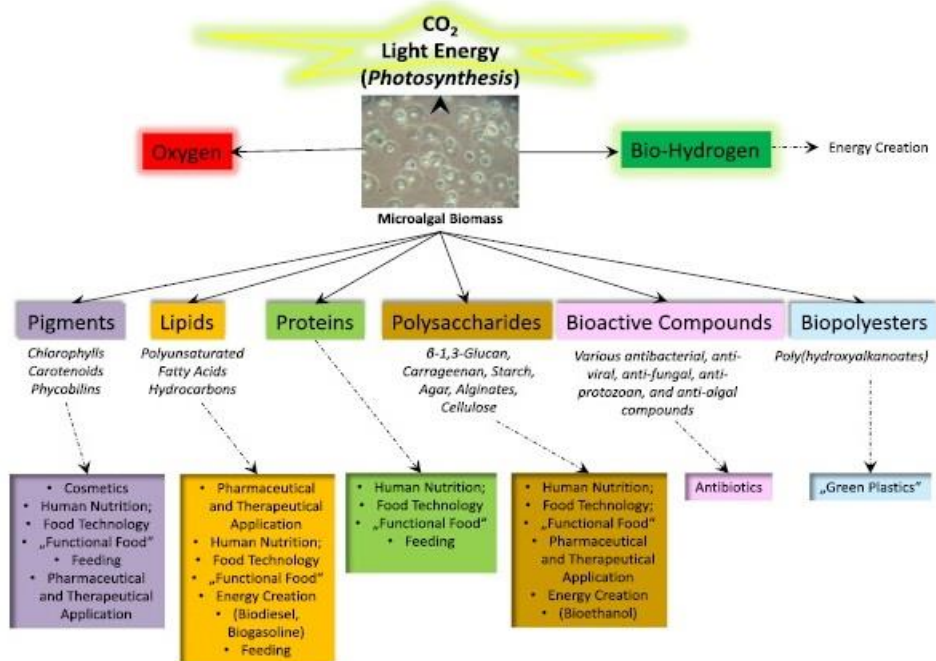


**Figura 3.-** Estructura química de algunos ácidos grasos poliinsaturados. Fuente: Gouveia et al., 2008.

Cabe mencionar que los aceites derivados de la biomasa de microalgas procedentes de plantas de producción controladas no presentan contaminantes en su composición, como son los metales pesados o los plaguicidas que se bioacumulan en las cadenas tróficas marinas.

- Proteínas: el elevado contenido proteico es más que una razón de peso para considerar las microalgas como una fuente no convencional de proteína. Contienen aminoácidos esenciales que no pueden ser sintetizados por la célula animal como la lisina, metionina, triptófano, treonina, valina, histidina e isoleucina; siendo comparables con los contenidos presentes en el huevo y la soja (Gouveia et al., 2008).
- Vitaminas y minerales: La biomasa de las microalgas representa una valiosa fuente de muchas vitaminas esenciales como son el tocoferol, el ácido ascórbico y vitaminas del grupo B. Además de altos niveles de micro (Fe, Zn, Mn y Cu) y macrominerales (Na, Ca, K y Mg) que las hacen particularmente importantes como suplementos para dietas vegetarianas (De la Jara et al., 2013; De la Jara et al., 2014; Gouveia et al., 2008).

Es por todo lo mencionado, que las microalgas se pueden considerar como un ingrediente y por tanto, alimento funcional, ya que se demuestra con sus compuestos bioactivos de gran interés, que afectan beneficiosamente a una o más funciones específicas del cuerpo humano, además de tener efectos nutricionales mejorando el estado de salud y bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedades (Kadam y Prabhasankar, 2010). En la figura 4 se presenta de forma resumida productos sintetizados por las microalgas y sus áreas de aplicación.



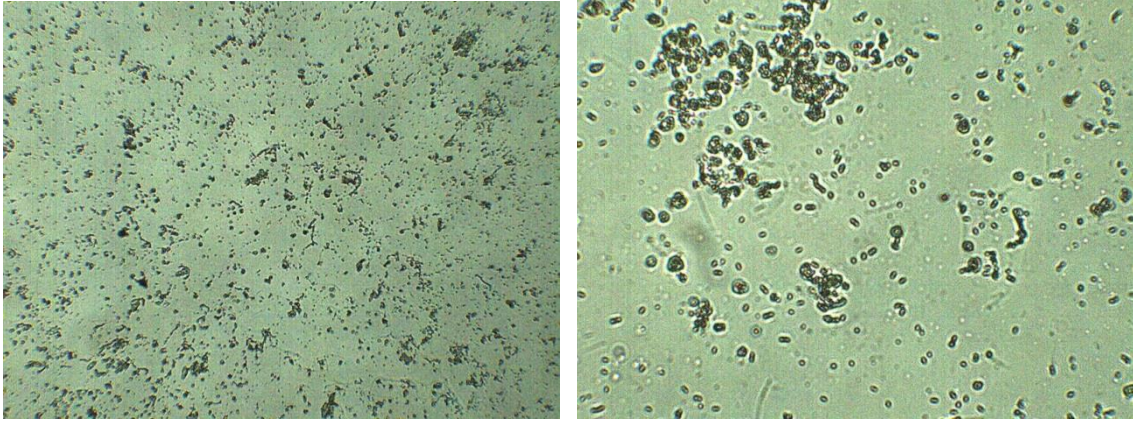
**Figura 4.-** Visión general de los productos sintetizados por las microalgas y sus áreas de aplicación. Fuente: Koller et al., 2014.

### 1.2.3. Especies de microalgas utilizadas

Las microalgas que se han utilizado para el diseño de pan objeto de este trabajo, las cuales se han incorporado a la masa madre a partir de la cual se ha realizado un pan artesanal, son las siguientes: *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Scenedesmus almeriensis* y *Nannochloropsis gaditana*. En el presente apartado se describen con brevedad las características más destacables de cada especie de microalga además de clasificarlas taxonómicamente.

*Isochrysis galbana* (ISO) (figura 5) es una microalga marina flagelada, perteneciente al reino *Plantae*, phylum *Haptophyta*, clase *Coccolithophyceae*, subclase *Prymnesiophycidae*, orden *Isochrysidales*, familia *Isochrysidaceae* y género *Isochrysis*. Sus células tienen un tamaño de 4-7  $\mu\text{m}$  y sin pared celular.

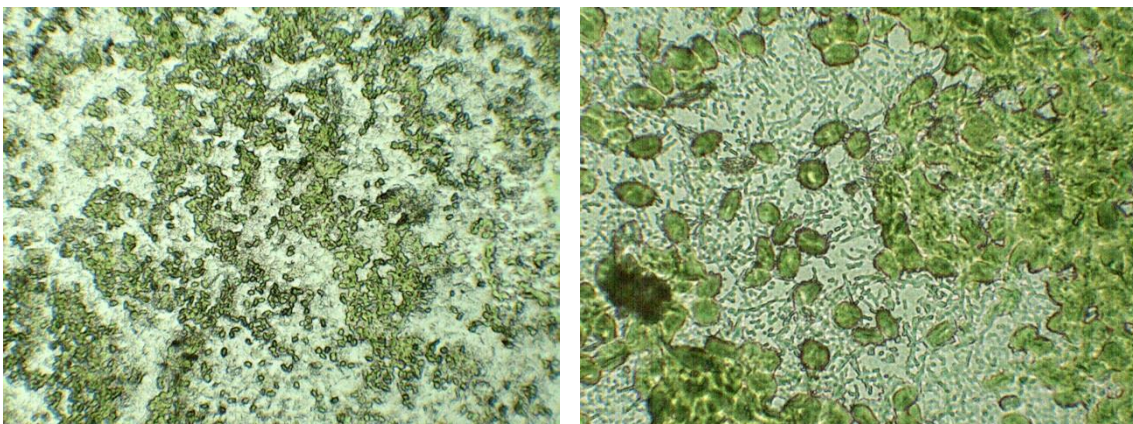
Esta microalga se caracteriza por una rápida tasa de crecimiento, amplia tolerancia a temperatura y salinidad y ausencia de toxinas. Como todas las microalgas, el crecimiento y la composición bioquímica de la *Isochrysis galbana* depende de las variaciones en las condiciones de cultivo, como por ejemplo, los nutrientes, temperatura, salinidad y fotoperiodo. Además, presenta un alto contenido de polisacáridos solubles e insolubles (representando el 13% de la materia seca), proteína y significantes porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados (Sadovskaya et al., 2014).



**Figura 5.-** Imagen al microscopio (zoom x10 y x40) de la especie *Isochrysis galabana*.

*Tetraselmis suecica* (TETRA) (figura 6) es una microalga marina unicelular y móvil de 10 a 15  $\mu\text{m}$  de tamaño, con forma elipsoidal que se reproduce por fisión longitudinal. Su clasificación taxonómica es la siguiente: reino *Plantae*, phylum *Chlorophyta*, clase *Prasinophyceae*, orden *Chlorodendrales*, familia *Chlorodendraceae* y género *Tetraselmis*.

Presenta un alto contenido en proteínas con ácido glutámico, ácido aspártico y leucina como aminoácidos más abundantes; hidratos de carbohidratos y minerales, siendo el calcio el elemento más abundante además de cloruros y sodio; las grasas representan el 6.7% del liofilizado, y aproximadamente el 50% de los ácidos grasos son poliinsaturados (PUFA), siendo el ácido linolénico el más abundante seguido por el ácido eicosapentanoico (EPA) (Picó et al., 2013).



**Figura 6.-** Imagen al microscopio (zoom x10 y x40) de la especie *Tetraselmis suecica*.

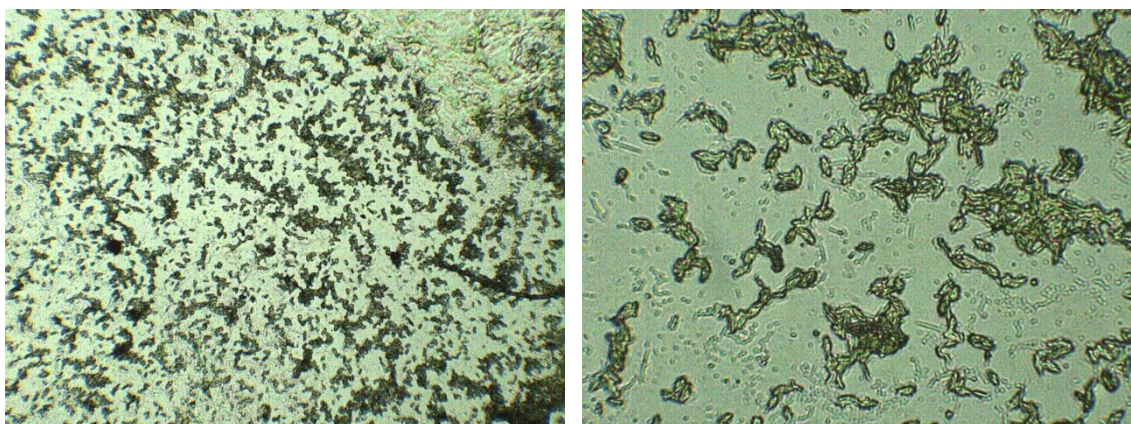
*Scenedesmus almeriensis* (SA) (figura 7) fue descubierta en el 2007 en la estación de Las Parmlerillas, Almería (Centro de Investigación Agroalimentario). Mientras un grupo de científicos investigaba en el cultivo de otra especie se desarrolló espontáneamente en los

biorreactores de la estación (Del Castillo et al., 2011). Es una especie dulceacuícola, verde, no-móvil que generalmente se agrupa formando colonias de 4 células, su tamaño se encuentra entre 12-14  $\mu\text{m}$  de ancho y 15-20  $\mu\text{m}$  de largo y sus células son elípticas donde algunas de ellas presentan espinas (Sociedad Española de Microalgas y Subproductos, 2015).

Cabe señalar algunas de sus fortalezas, como son su elevada velocidad de crecimiento y gran tolerancia a condiciones de cultivo extremas, creciendo en amplios rangos de temperaturas y pHs, además de tolerar elevadas concentraciones de cobre. Posee una pared celular muy resistente que la protege de fenómenos de estrés mecánico. Contiene una composición bioquímica distintiva ya que su contenido en carotenoides es muy poco usual, especialmente en luteína, llegando a valores muy altos de concentración de 500mg/100g de materia seca (Universidad de Almería, 2012).

La Luteína es un pigmento amarillento de la familia de los carotenoides (xantofilas), que no es producida por el cuerpo, por lo tanto, debe ser obtenida a partir de la ingesta de alimentos. Está presente en los ojos (protegiendo la retina), el suero, la piel, la nuca, el cerebro y el pecho. La luteína tiene propiedades antioxidantes que protegen al organismo del ataque de los radicales libres, siendo muy importante a la hora de prevenir procesos tumorales y cancerígenos, mejorando el sistema inmune y la comunicación celular (Del Castillo et al., 2011).

Además de dicho contenido inusual de luteína, presenta un considerable contenido de proteína (49.4% de proteína cruda en base seca) y un perfil de ácidos grasos poliinsaturados con grandes cantidades de ácido linolénico (Vizcaíno et al., 2014).

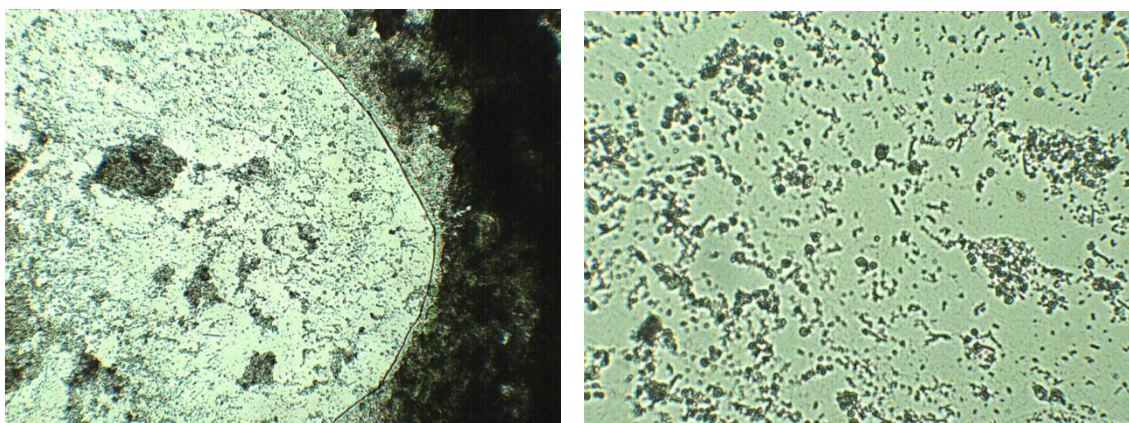


**Figura 7.-** Imagen al microscopio (zoom x10 y x40) de la especie *Scenedesmus almeriensis*.

*Nannochloropsis gaditana* (NANNO) (figura 8) es una especie que en su mayoría ha sido conocida en el medio marino, pero también se produce en el agua dulce y salobre (Sociedad Española de Microalgas y Subproductos, Abril 2015).

Su origen se da en la Bahía de Cádiz y esta nueva especie, que se obtiene a partir de dos especies: *N. oculata* (subesférica de 2-4 $\mu$  de diámetro) y *N. salina* (cilíndrica de 3-4 x 1.5-1.7 $\mu$ ), pertenece a la clase *Eustigmatophyceae* y género *Nannochloropsis* (*Monopsidaceae*). Sus células presentan una forma elipsoidal de 3.5-4 x 2.5-3  $\mu$ , son inmóviles y desprovistas de flagelos. Su pared celular es lisa sin cubierta mucilaginosa y formada de una sola pieza, siendo gruesa y resistente. Es una especie autótrofa y no requiere vitaminas para su crecimiento, además frente a factores como la salinidad, temperatura e intensidad lumínica, tolera un amplio rango de salinidades y una baja intensidad saturante de luz en comparación con otras algas, probablemente debido a la presencia de una sola clorofila, confiriendo menor estabilidad al aparato fotoquímico en presencia de altas intensidades lumínicas.

Cabe destacar que, además de clorofila a,  $\beta$ -caroteno, violaxantina como carotenoide mayoritario y vaucheriaxantina, que se encuentran en las dos especies por la que está formada la microalga, presenta de manera constante en su composición  $\alpha$ -caroteno, que es un tipo de caroteno, el cual a su vez pertenece a los pigmentos antioxidantes de los carotenoides (Lubián, 1982).



**Figura 8.-** Imagen al microscopio (zoom x10 y x40) de la especie *Nannochloropsis gaditana*.

Para finalizar, en la tabla 1 se muestra a modo resumen los porcentajes de los compuestos más importantes que se encuentran en cada una de las especies de microalgas citadas. En ella se puede observar que la especie con más proteína es la *Isochrysis*, la que contiene más cantidad de carbohidratos es la *Scenedesmus* y el mayor contenido lipídico se encuentra en la *Nannochloropsis*.

**Tabla 1.-** Composición química de las especies de microalgas utilizadas.

<b>Composición</b>	<b><i>Isochrysis galbana</i></b>	<b><i>Tetraselmis suecica</i></b>	<b><i>Scenedesmus almeriensis</i></b>	<b><i>Nannochloropsis gaditana</i></b>
<b>Proteínas</b>	50-56 %	37.6 %	48.3 %	52 %
<b>Carbohidratos</b>	10-17 %	31.6 %	38.3 %	12 %
<b>Lípidos</b>	12-14 %	6.7 %	10 %	28 %

Fuente: *Isochrysis galbana* (de la Jara et al., 2014), *Tetraselmis suecica* (Picó et al., 2013), *Scenedesmus almeriensis* (Molina, 2006) y *Nannochloropsis gaditana* (Sociedad Española de Microalgas y Subproductos, 2015).

### 1.3. Pan junto con microalgas

La incorporación de microalgas a la alimentación humana no es tan reciente como parece. Los primeros documentos escritos que recogen testimonio de su consumo aparecen, por una parte, a través de los conquistadores que llegaron a México y se sorprendieron al ver consumir a los aztecas unas tortas verdeazuladas que recolectaban en el lago Texcoco y que secaban al sol (de la Jara et al., 2013; Safi et al., 2014). Estas tortas se llamaban tecuitlal y hoy en día se sabe que estaban compuestas fundamentalmente por *Spirulina*. Por otra parte, al otro lado del océano, en el continente africano, a orillas del lago Chad, también se consumía dibé, un alimento similar al de los aztecas, tanto en composición como en aspecto, que ha mantenido a la población local durante siglos (de la Jara et al., 2013).

No fue hasta principios de los años 50 del siglo pasado cuando comenzó a desarrollarse la llamada biotecnología de microalgas debido a la necesidad de una fuente alternativa de proteína para la gente mal nutrida en países en vías de desarrollo y también para combatir la crisis alimentaria a la que el mundo estaba enfrentándose en aquel momento (de la Jara et al., 2013; de la Jara et al., 2014).

Tanto en el pasado siglo como en la actualidad, ya son varios los países que incorporan las microalgas en su alimentación, como por ejemplo en Asia, Centro y Sud América, en las islas del Pacífico y en los Estados Unidos. Las especies más populares consumidas en este último país son las microalgas verdes, *Chlorella* y *Scenedesmus*; y las cianobacterias *Spirulina* y *Aphanizomenon*. Es por ello que han habido varios estudios toxicológicos y nutricionales donde evalúan el efecto de dichas especies en los humanos (Szabo et al., 2012).

Sin embargo, según el libro “Microalgae: biotechnology and microbiology” (Becker, 1995), son muy pocos los estudios anteriormente mencionados que hayan sido llevados a cabo durante mucho tiempo para saber realmente los efectos a largo plazo que podrían causar las

distintas especies de microalgas, por lo que la información disponible es aún incompleta para concluir una declaración contundente en el caso de alguna de las millones de especies de microalgas.

Varios estudios han sido realizados con las especies de microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus*, en diferentes partes del mundo, como África, Asia, Alemania, Rusia, Perú y Tailandia; con niños malnutridos, personas que han vivido solo alimentándose a partir de algas durante un cierto periodo de tiempo, personas sanas de entre 18-23 años y de entre 27-33 años.

De todos ellos se concluyó que:

- Los primeros que se realizaron solo toleraban una cantidad de hasta 100-200 g de microalgas, ya que más les provocaba un sabor desagradable, flatulencias, vómitos y náuseas. Se dedujo que los síntomas fueron causados por el poco procesamiento de las microalgas utilizadas y un periodo de estudio muy corto.
- Con los estudios más recientes comprobaron que a partir de más de 100g ya se obtuvieron cambios en parámetros metabólicos; se demostró un efecto positivo como fuente de lisina y treonina; y en niños con una ingesta de 10 g al día se producía un aumento del peso.

Actualmente, ya son varias las especies de microalgas admitidas en la reglamentación de alimentos, como es el caso de *Dunaliella*, *Schyzochitrium*, *Odontella*, *Spirulina*, *Chlorella* y recientemente en el 2014, *Tetraselmis* (de la Jara et al., 2014).

Sin embargo, son pocos los estudios de investigación, y por tanto los alimentos en el mercado, donde encontramos las microalgas como ingrediente. Algunos de ellos incorporan: *Chlorella* a galletas de mantequilla con porcentajes de 0.5%, 1%, 2% y 3% (Gouveia et al., 2007) (figura 9 izquierda); *Spirulina* 5%, 10% y 20% a masa de pan de trigo (Rodríguez et al., 2014); *Isochrysis* a galletas con 1% y 3% (Gouveia et al., 2008) (figura 9 derecha), y 0.5%, 1% y 2% a pasta fresca (Fradique et al., 2013) (figura 10). De todos ellos se puede concluir que una cantidad mayor al 3% de microalgas en el producto final ya supone un rechazo por el consumidor debido al fuerte sabor de ellas y al intenso color verde que presentan.



**Figura 9.-** Galletas con microalgas (izquierda: *Chlorella*; derecha: *Isochrysis*). Fuente: Gouveia et al., 2007 y Gouveia et al., 2008.



**Figura 10.-** Pasta con *Isochrysis*. Fuente: Fradique et al., 2013.

Es por todo lo descrito anteriormente que se decidió el diseño de un pan artesanal con masa madre donde se introdujeron las microalgas, después de varias pruebas previas, en un porcentaje de 1.5%.

#### 1.3.1. Jesús Machí

Jesús Machí es maestro panadero recientemente galardonado con el Premio a Mejor Maestro Panadero de 2015 por la Real Academia de Gastronomía de la Comunidad Valenciana. Participa en numerosos cursos de formación para profesionales amateurs interesados por el mundo de la panadería artesana. Colabora en congresos y foros profesionales tanto nacionales como internacionales.

Para llevar a cabo este proyecto, se ha contado con la experiencia del maestro panadero Jesús Machí, que había observado una mayor actividad de su masa madre tras la incorporación de *Isochrysis galbana*. Con esta masa madre enriquecida hizo alguna prueba con resultados muy positivos. De este modo, contando con la colaboración del Maestro Machí, se realizó el diseño experimental para la consecución de un pan especial enriquecido en microalgas, que es el objetivo principal de este trabajo.



## Capítulo 2. Objetivos

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de panes con la incorporación de 4 diferentes especies de microalgas a una masa madre (proporcionada por el maestro panadero Jesús Machí). Se pretende que el producto obtenido se caracterice por ser innovador y enriquecer el pan con los componentes beneficiosos que proporcionan las microalgas. Se busca conseguir un nuevo producto de alto valor nutricional y dar una alternativa a la producción de microalgas para biodiesel y utilizarlas como fuente alimentaria.

### 2.2. Objetivos específicos

- Observación de las características físico-químicas de las masas madre y de panes con las diferentes microalgas.
- Caracterización microbiológica de las masas madre.
- Aceptación del producto por parte del consumidor mediante análisis sensorial.

## Capítulo 3. Materiales y Métodos

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Plan de trabajo

Para la realización de la innovadora producción de pan a partir de masa madre con diferentes especies de microalgas y por tanto lograr los objetivos mencionados en el apartado anterior, se ha seguido el siguiente plan de trabajo:

1. Conocimiento de las necesidades del maestro panadero Jesús Machí. Se realiza una puesta en común de las diferentes pruebas de pan con masa madre de microalgas, y los resultados preliminares observados: parece incrementar la actividad de la masa madre y el sabor de los panes obtenidos era muy agradable. La comprobación de estas dos premisas constituyen la base del presente estudio.
2. Definición de los objetivos del trabajo con la incorporación de 4 especies de microalgas para su posterior comparación.
3. Búsqueda bibliográfica relacionada con: nuevos productos alimentarios con microalgas; características, propiedades y métodos de obtención de las 4 microalgas utilizadas; análisis físico-químicos y microbiológicos en pan como también los parámetros de calidad; y normativas vigentes con respecto a pan y microalgas autorizadas para el consumo humano.
4. Pruebas preliminares de panes con microalgas para observar cambios de color y sabor.
  - a. Panes a partir de preparados para panificación (de cereales y normal) usando diferentes porcentajes de microalga *Tetraselmis suecica*: 0.5%, 1%, 1.5% y 2%.
  - b. Panes a partir de masa madre crecida con microalga *Isocrysis*, proporcionada por el maestro panadero, (no se conoce el porcentaje incorporado a esta).
5. Elaboración de la formulación final para la obtención de los resultados para nuestro estudio con la incorporación de un porcentaje fijo a la masa madre de las 4 diferentes especies de microalgas: *Tetraselmis suecica*, *Isocrysis*, *Nannochloropsis gaditana* y *Scenedesmus almeriensis*.
  - a. Elección del porcentaje más adecuado a añadir de microalgas a la masa madre para la formulación del pan.
  - b. Estudio del efecto de la incorporación de microalgas sobre parámetros físico-químicos y microbiológicos, tanto para las masas madre como para el pan.
  - c. Medida del perfil sensorial y aceptación del producto por parte de los consumidores.

- d. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, elección de la mejor microalga.

### 3.2. Materias primas e ingredientes

Para la realización de las diferentes formulaciones de pan, se utilizaron los siguientes ingredientes y materias primas. El principal fue la harina de trigo de fuerza proporcionada por el maestro panadero Jesús Machí, que se caracteriza por ser obtenida de manera natural mediante la molturación del grano de trigo maduro, entero, sano, seco y desprovisto del salvado y germen. Presenta unas características químicas del 13 g/100 g de proteínas, de las cuales un 25% aprox. corresponde al gluten, 15 g/100 g de humedad y 0.8% de cenizas. Además se encuentra libre de puntos negros y/o materias extrañas, con color blanco uniforme y con olor y sabor característicos de la harina.

Otro de los ingredientes principales para la elaboración de pan, fue el uso de agua de mar, ya que al introducir microalgas que se encuentran de forma natural en él, se pensó que con ello se realzaría el sabor característico de estas peculiares formas de vida. El agua de mar empleada es apta para consumo humano, y proporcionada por la única empresa que se dedica a la producción y venta de agua de mar, "Mediterránea agua de mar". La forma de obtención de dicha agua se realiza a partir de un sencillo proceso que consta de las siguientes fases: extracción, donde se capta el agua en diversos puntos de la costa de estado muy bueno con agua de la mayor pureza; análisis una vez en planta para descartar la presencia de contaminantes microbiológicos y químicos; microfiltración, donde se purifica de manera que eliminan los compuestos orgánicos, fitoplacton, zooplacton y bacterias, todo ello seguido de una esterilización en frío; y finalmente, antes del proceso de envasado, se realiza un proceso final de eliminación de boro.

La masa madre utilizada, fue proporcionada también por el maestro panadero, obtenida por elaboración propia del mismo durante 17 años. El método de creación de masa madre empleado por Jesús Machí se resume a continuación:

- Mezcla de agua con manzana 50% + harina integral 50%.
- La masa obtenida se somete a 3 días de fermentación a 30-32°C.
- Mezcla de 0,5 kg de la primera masa + 0,5 kg harina blanca (13-15% proteína).
- Refrescar hasta 21 días para conseguir actividad de los microorganismos propios de la masa y, por tanto, de la harina, para así ya poder realizar pan.
- Finalmente, para refrescar la masa madre y por tanto, mantener su actividad microbiológica, se incorporan 2 cucharadas de harina de aproximadamente 15 gramos

al día a una temperatura de 25°C. Para su conservación, la masa es introducida en refrigeración a 7-9°C a 70-85% de humedad relativa controlada.

Por último, el ingrediente diferencial empleado, y que confiere el carácter innovador y funcional son las microalgas proporcionadas por la Universidad de Almería, con todas sus características y propiedades destacadas en el punto 1.2 del presente trabajo.

### 3.3. Proceso de elaboración

Para definir las características deseables del producto se realizaron unas pruebas preliminares con el fin de determinar el color y sabor óptimos para el mismo. Se elaboraron los panes presentados en la tabla 2 siguiendo las instrucciones de los premixes de panificación, utilizando en esta fase una panificadora eléctrica marca SEVERIN, con el programa de elaboración normal de panes.

**Tabla 2.-** Pruebas preliminares.

Ingredientes	<i>Tetraselmis Suecica</i>					<i>Isochrysis galbana</i>	
	Harina cereales		Harina normal			Harina Jesus	
	Pan 1%	Pan 2%	Pan 0,5%	Pan 1%	Pan 1,5%	Pan ¿?%	Pan ¿?%
	Cantidad (g)		Cantidad (g)			Cantidad (g)	
Harina	250	250	250	250	250	250	250
Alga	4	8	2	4	6		
Agua	150	150	150	150	150	150	100
Levadura	3,5	3,5	Incorporada	Incorporada	Incorporada		
Masa madre						100	100
Sal							5

Fuente: Elaboración propia.

Estos panes solo fueron evaluados por el aspecto visual y sabor, con dicho estudio previo se estableció el porcentaje de microalgas a incorporar en la masa madre. De los resultados se definió un 1.5% de microalgas como el óptimo por los parámetros considerados de aspecto y sabor.

Para el proceso de elaboración del pan artesano con masa madre, se siguieron las indicaciones proporcionadas por el maestro panadero. El porcentaje de todos los ingredientes con los que se realiza el pan van en relación sobre la harina, según el procedimiento artesanal tradicional.

Las proporciones de cada ingrediente con respecto a la harina para la elaboración de pan son las siguientes: Harina 100%, masa madre 40%, agua 50-60% y sal 2%.

A 500 gramos de masa madre, se incorporaron 7.5 gramos de cada una de las diferentes especies de microalgas con el fin de obtener el porcentaje estimado. Se mezclaron y se dejaron en una cámara de Tª y humedad controlada.

Para proceder a la elaboración del pan, las masas madre con microalgas se dejaban atemperar durante dos horas a unos 25°C, incorporándoles una cucharada de harina y la misma cantidad de agua para reactivar la masa y así poder realizar el pan. Este proceso de reactivación fue también el empleado para el tratamiento previo de las muestras de masa madre de cara a las determinaciones de los parámetros físico-químicos y microbiológicos.

En la tabla 3 se muestran las formulaciones estudiadas.

**Tabla 3.-** Formulaciones estudiadas.

	Pan 1	Pan 2	Pan 3	Pan 4	Pan 5
Ingredientes	Cantidad (g)	Cantidad (g)	Cantidad (g)	Cantidad (g)	Cantidad (g)
Harina	100	100	100	100	100
Agua	-	-	-	-	-
Masa madre	40	40	40	40	40
Sal	-	-	-	-	-
Agua de mar	50	50	50	50	50

Nota: El pan 1 corresponde con la microalga *Isochrysis galabana*, pan 2 *Tetraselmis suecica*, pan 3 *Scenedesmus almeriensis*, pan 4 *Nannochoreopsis gadityna* y pan 5 sin microalgas.

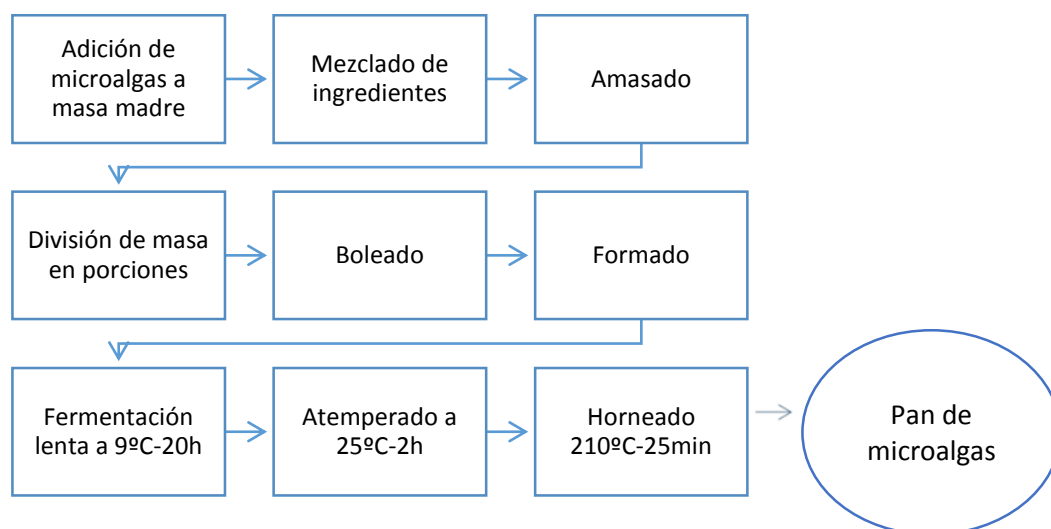
Las masas, una vez pesados y mezclados los ingredientes, se dejaban reposar 10 minutos para que cogieran algo de fuerza, se procedía a pesarlas (peso aproximado de 190 gramos), y se separaban en tres porciones de 63 gramos aproximadamente cada una. Seguidamente se realizaba el boleado de la masa de manera también manual. Una vez formadas las bolas, se dejaban reposar unos 10-15 minutos y se procedía al formado de la masa e introducción en los moldes.

Las masas se introducían en refrigeración a 9°C durante 20 horas para conseguir una primera fermentación lenta. Tras la primera fermentación, se sacaban las masas de refrigeración y se dejaban atemperar durante 2 horas antes de la introducción en el horno a vapor.

Finalmente se procedía al horneado de las masas panarias a una temperatura de 210°C durante 25 minutos, con un precalentamiento previo del horno a 210°C durante 15 minutos.

Una vez obtenido el pan, se dejaba enfriar antes de proceder a los análisis de las muestras.

Todo este proceso artesanal de elaboración de panes se esquematiza en el diagrama de flujo que se muestra en la figura 11.



**Figura 11.-** Diagrama de flujo de elaboración del pan para el presente trabajo.

### 3.4. Análisis físico-químico

#### 3.4.1. Actividad de agua

Se utilizó un medidor de la actividad de agua AquaLab Dewpoint Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, USA). Las mediciones de las muestras se realizaron por triplicado tanto para las formulaciones de las masas madres como para las de los panes.

#### 3.4.2. Humedad

La obtención de los valores de humedad tanto para las masas madres como para los panes, se realizó mediante el método de desecación en estufa de secado con bomba a vacío *Vacioterm* modelo P-selecta (Selecta S.A., Barcelona, España) a 70°C hasta peso constante según el método de la AOAC 934.01.

La determinación se realizó por gravimetría por diferencia. Las mediciones se efectuaron por triplicado para cada muestra. En el caso de las masas madre se introdujeron 5 gramos de éstas en crisoles previamente secados durante 24h; y para la obtención de humedad en pan, se introdujeron 5 gramos en flaneras de aluminio dispersados con arena de mar y alcohol para poder proporcionar una mejor evaporación del agua y evitar el apelmazamiento en las muestras, ya que se trata de un producto con un relativamente bajo porcentaje de agua en su composición después del horneado.



#### 3.4.3. Color

Para la medición instrumental de esta propiedad óptica se utilizó un espectrocolorímetro Minolta CM-700d (Minolta Co., Tokyo, Japan) obteniendo las coordenadas CIE-L\*a\*b\* con un iluminante estándar D65 y un observador o ángulo de visión estándar de 10°.

Dichas coordenadas se obtuvieron tanto para la masa madre como para el pan. En el caso de la masa madre, se realizaron tres repeticiones para cada tipo de formulación y en cada una de ellas se tomaron datos en 5 puntos diferentes. Con respecto al pan, se adquirieron datos de color en la corteza y en la miga. Para obtener las coordenadas, se realizó el mismo procedimiento que con las masas madres, pero en la miga se tomaron datos en 6 puntos diferentes.

#### 3.4.4. pH

La determinación del pH se efectuó con un pH-metro C830 (Consort nv, Bélgica) tanto para la diferentes masas madre como para los panes.

Para la caracterización de las masas madre se realizaron 3 mediciones por muestra a una temperatura de entre 20°C y 22°C.

Para el caso de los panes, 10g de pan fueron pesados y se añadieron 90mL de agua ionizada formando así una suspensión para la posterior lectura. También se realizaron 3 mediciones por muestra a una temperatura de entre 21°C y 23°C.

#### 3.4.5. Acidez

Para la determinación de la acidez se utilizó un valorador automático (titrator) modelo 902 Metrohm (Gomensoro S.A Madrid, España). Dicho equipo se basa en un método potenciométrico con una titulación a punto final 8.5, realizada con el electrodo de pH según el método de valoración de pH y grado de acidez para cereales, productos molidos de harina y pasta seca, proporcionado por el mismo equipo.

A los 10g de pan junto con 90mL de agua ionizada preparados para el método anterior, se añadieron 100mL de agua ionizada para formar una suspensión más diluida. La determinación se realizó por triplicado.

#### 3.4.6. Viscosidad

La determinación de la viscosidad se realizó con un viscosímetro Smart Series TSML 211239, Fungilab S.A (Sant Feliu de Llobregat, Barcelona, Spain).

Las mediciones fueron repetidas 3 veces a diferentes velocidades para cada formulación de masa madre, obteniendo así directamente resultados de viscosidad en centipoise (cP). Este parámetro fue medido con el usillo L4 y velocidades de 20, 12 y 10 rpm.

#### 3.4.7. Textura

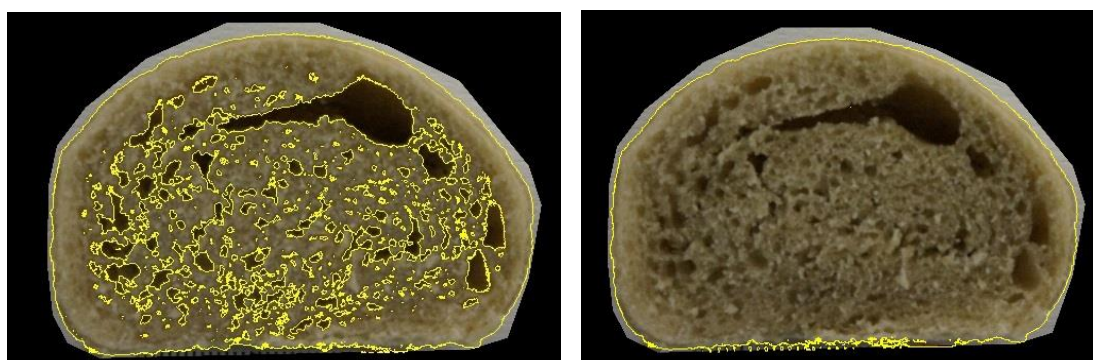
Se realizó un test de doble compresión usando el texturómetro TA-XTPlus (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, UK) y software TextureExponent Lite 32 (versión 4.0.8.0) con el fin de caracterizar la textura de los panes realizados, observando la influencia de las 4 diferentes microalgas utilizadas en la formulación.

El ensayo se llevó a cabo mediante dos compresiones cíclicas con rodajas de 25 mm de grosor y bajo las siguientes condiciones: 40% de compresión, fuerza de 0.098 N, velocidad de 1.7 mm/s, velocidad post-test de 10 mm/s, tiempo entre ciclos de 15 s y una fuerza de “trigger” de 0.049 N, según (Jekle y Becker, 2012). Se utilizó un émbolo SMS P/75 de (7.5 cm diámetro).

Se realizaron 3 mediciones para la caracterización de la miga y otras 3 para la corteza con los diferentes tipos de panes. A partir de la curva de fuerza en gramos (g) vs. tiempo en segundos (s) se midieron las siguientes propiedades mecánicas: dureza (g), adhesividad (g x s), elasticidad, cohesividad, gomosidad y masticabilidad.

#### 3.4.8. Tamaño de alveolo

Para la obtención del tamaño de los alveolos resultantes del proceso de horneado del pan, se realizó un análisis de imagen con el programa IMAGEJ, a partir de fotografías (figura 12) realizadas con una Cámara Sony  $\alpha$ -330, por triplicado para cada tipo de pan formulado. Se determinó el área total de las rodajas de pan, el área sin los alveolos y a partir de estos dos datos, se obtuvo la porosidad de cada muestra.



**Figura 12.-** Imagen de las áreas (marcadas con amarillo) de la rodaja de pan sin tener en cuenta los alveolos (izquierda) y de la rodaja de pan total (derecha).

### 3.5. Análisis microbiológico

Con el fin de analizar la microflora de las diferentes masas madre y así observar la influencia de las 4 microalgas utilizadas en la carga microbiana con respecto a una masa madre sin la incorporación de estas, se realizó un recuento total en placa de aerobios mesófilos, bacterias lácticas y levaduras, ya que componen la principal microflora de las masas panarias para producir las diferentes vías fermentativas del pan (alcohólica, láctica y acética).

Para el recuento de los aerobios mesófilos se utilizó el medio PCA (Plate Count Agar) y se incubó a 30°C durante 48 horas. Para las bacterias lácticas utilizamos el medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe, Scharlab S.L., Barcelona, España) incubándose a 37°C durante 48 horas. Y por último para el recuento de levaduras se utilizó el medio Sabouraud glucosado con una incubación de 25°C durante 48 horas.

### 3.6. Análisis sensorial

Se realizó un análisis sensorial con el fin de evaluar las formulaciones de pan con las diferentes especies de microalgas en base a los resultados obtenidos en las determinaciones analíticas previas. La finalidad del análisis fue evaluar la preferencia de los catadores frente a las 4 microalgas utilizadas para la formulación del pan, obtener cual de ellas es mejor aceptada, saber si el consumidor es capaz de identificar sabores no habituales en el pan y si el hecho de conocer que el producto testado presentaba microalgas influye en su valoración y decisión de compra.

Cabe señalar que las muestras que se presentaron a los catadores fueron realizadas por el panadero Jesús Machí, colaborador clave para este estudio, para que de este modo los catadores tuvieran una mejor apreciación del producto real al catar los panes recién hechos de manera tradicional y con sus propiedades óptimas.

Las muestras fueron suministradas a la vez en porciones de forma cúbica de 1-2 cm cada una y evaluadas en una escala hedónica de 9-puntos (UNE EN-ISO 4121:2006), siendo 9 la mejor puntuación y 5 el punto medio.

En el cuestionario que se les presentaba al panel los atributos evaluados fueron: sabor, intensidad de sabor, textura, color, aceptación global e intención de compra (Anexo 1). Este análisis sensorial se llevó a cabo con un panel compuesto por 42 catadores, no expertos y no entrenados.

## Capítulo 4. Resultados y discusión de resultados

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### 4.1. Análisis de las masas

Todos resultados que se presentan a continuación, se obtuvieron a partir de las diferentes masas madre con las que se elaboraron los panes artesanales diseñados para el presente proyecto.

#### 4.1.1. Actividad de agua, Humedad y pH

La actividad de agua (*aw*) se define como la relación que existe entre la presión de vapor del agua en equilibrio con el alimento y la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura, es decir, la cantidad de agua libre que hay en un alimento y que está disponible para reaccionar químicamente con otras sustancias y provocar el crecimiento microbiano.

La humedad de los alimentos es la cantidad de agua que un alimento presenta en su composición, sin hacer referencia a qué fracción del agua está ligada a otras sustancias. No obstante, se puede establecer un límite del 25% de humedad para poder considerar a un alimento como húmedo o de humedad intermedia (mayor al 25%), o bien como alimento seco (menor al 25%).

Y por último, el pH es un indicador de la cantidad de iones libres de hidrógeno que un alimento contiene. Esta propiedad nos informa sobre el carácter ácido o básico que presenta el alimento, teniendo relación con la calidad del mismo, ya que unas determinadas condiciones de pH y temperatura pueden influir de manera notable en el desarrollo de microorganismos y en determinadas reacciones químicas entre los solutos presentes en el alimento.

Se realizó un análisis estadístico (Anexo 2) con los diferentes resultados obtenidos a partir de las masas madre para *aw*, humedad y pH, los cuales se muestran en la tabla 4 con sus medias y desviación estándar.

**Tabla 4-** Resultados de *aw*, humedad y pH para las diferentes formulaciones de masa madre.

	Media $\pm$ desviación estándar		
	<i>aw</i>	Humedad (%)	pH
ISO	0,9803 $\pm$ 0,0009	37,7 $\pm$ 7,9	3,87 $\pm$ 0,11
TETRA	0,9837 $\pm$ 0,0011	52,3 $\pm$ 7,5	3,74 $\pm$ 0,02
SA	0,9823 $\pm$ 0,0019	49,3 $\pm$ 0,2	3,74 $\pm$ 0,06
NANNO	0,9804 $\pm$ 0,0010	57,2 $\pm$ 8,1	3,72 $\pm$ 0,01
Blanco	0,9854 $\pm$ 0,0006	50,9 $\pm$ 0,1	3,72 $\pm$ 0,02

Con respecto a la aw de agua, se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las masas con *Isochrysis* y *Tetraselmis*; *Isochrysis* y masa madre normal; *Tetraselmis* y *Nannochloropsis*; *Scenedesmus* y masa madre normal; y *Nannochloropsis* y masa madre normal. Pudiendo afirmar que, aunque los valores son muy similares entre sí, la adición de las microalgas *Isochrysis*, *Scenedesmus* y *Nannochloropsis* a la masa madre produce un descenso significativo de la aw con respecto a la masa madre sin microalgas.

Con los valores de humedad en cambio, solo encontramos diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la masa madre con la especie *Isochrysis* y todas las demás utilizadas. Finalmente, con el pH ocurre lo mismo que con la propiedad anterior, es decir, que la incorporación de la especie *Isochrysis* a la masa madre resulta en un descenso significativo del pH de la misma, y por tanto, presenta un carácter más ácido en comparación con las demás masas madres.

De estas determinaciones se puede concluir que la introducción de *Isochrysis galbana* a una masa madre elaborada de manera tradicional produce cambios significativos en las propiedades de aw, humedad y pH para los alimentos, disminuyendo todas ellas.

#### 4.1.2. Color

El color es un conjunto de señales que entran en el cerebro a través del sentido de la vista. Pero se ha de definir el color psicofísico como la medida que tiene por objeto relacionar el color físico con el percibido. Esta cuantificación se realiza a través de coordenadas de color, que representan la respuesta de cada cono del ojo al estímulo percibido. Estas respuestas dependerán del estímulo luminoso exterior y de la respuesta del ojo.

Las mencionadas coordenadas de color se cuantifican con los espacios uniformes de color, siendo el espacio CIE  $L^*a^*b^*$  uno de los más utilizados en ciencia y tecnología de alimentos. Donde se define:

- $L^*$  (eje vertical de espacio CIE  $L^*a^*b^*$ ): atributo de la sensación visual según la cual una superficie emite más o menos luz.
- $a^*$  (eje horizontal): Representa una medida del contenido de rojo ( $a^*$  positiva) o verde ( $a^*$  negativa) de un color.
- $b^*$  (otro eje horizontal y perpendicular al eje  $a^*$ ). Los valores positivos indican contenido de amarillo, y los negativos contenido de azul.

A partir de estas coordenadas se pueden obtener los atributos de color percibido que se definen como:

- $h^*$ , es el tono, el atributo según el cual una superficie parece similar a uno, o proporciones de dos, de los colores percibidos: amarillo, naranja, rojo, verde, azul y

púrpura. Se trata del ángulo que mide la tonalidad, indicando la orientación relativa del color respecto al origen 0°.

$$h^* = \arctg \frac{b^*}{a^*}$$

- C\*, es la pureza, medida de la saturación, que es el contenido de color de una superficie evaluado en proporción a su luminosidad. Es medida desde el punto central del espacio de color que se extiende hacia fuera de dicho punto. Un color con un valor alto de C\* es un color altamente saturado.

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

- ΔE, es la diferencia global de color, donde a los valores de las muestras se le restan los valores tomados como referencia.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2}$$

Debido a los pigmentos de color (por ejemplo la clorofila) que presentan las microalgas, de los cuales ya se ha hablado en el apartado 1.2.2, siempre vamos a encontrar diferencias significativas (p<0.05) entre las coordenadas y los atributos que cada tipo de especie proporciona a la masa madre con respecto a la masa sin ninguna de ellas. Es por lo que, se fijaron los valores de L\*, a\* y b\* (media y desviación estándar) como referencia de la masa madre, para calcular las diferencias de color entre las muestras con cada microalga.

Para todos los valores de L\*, a\*, b\*, h\* y C\* (tabla 5), se hallaron diferencias significativas (p<0.05) entre todas las especies, excepto entre: *Scenedesmus almeriensis* y *Tetraselmis suecica* con respecto a L\*, *Scenedesmus almeriensis* e *Isochrysis galbana* con respecto a a\*, *Nannochloropsis gaditana* y *Tetraselmis suecica* con respecto a b\*, *Nannochloropsis gadityna* y *Scenedesmus almeriensis* con respecto a h\*, y *Nannochloropsis gadityna* y *Tetraselmis suecica* con respecto a C\*.

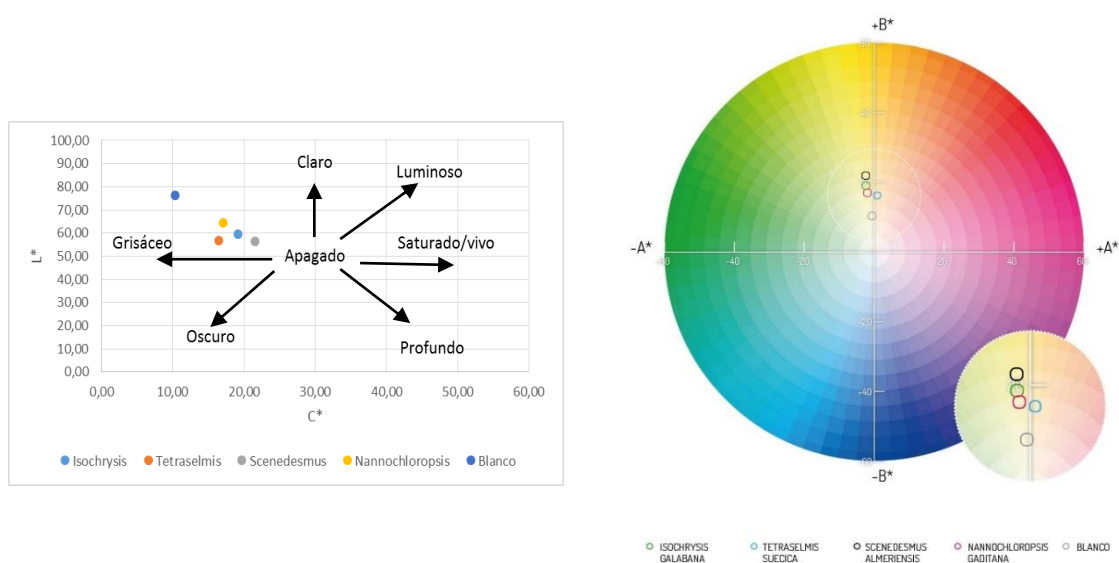
En el caso de los valores de diferencia de color (ΔE) con respecto a la masa madre sin adición de microalgas, se encuentran diferencias significativas (p<0.05) entre todas las muestras, por lo que las masas con cada especie microalga presentan una coloración diferente entre ellas.

**Tabla 5.-** Resultados de coordenadas y atributos de color de las diferentes formulaciones de masa madre estudiadas.

	Media ± desviación estándar					
	L*	a*	b*	h*	C*	ΔE
ISO	59,60 ± 1,04	-2,36 ± 0,08	19,02 ± 0,39	3,02 ± 0,00	19,16 ± 0,40	18,94 ± 0,75
TETRA	56,30 ± 1,19	0,85 ± 0,14	16,45 ± 0,77	0,05 ± 0,01	16,47 ± 0,77	20,44 ± 0,92
SA	56,28 ± 1,20	-2,41 ± 0,07	21,44 ± 0,84	3,03 ± 0,01	21,58 ± 0,82	23,02 ± 0,81
NANNO	64,57 ± 1,45	-1,94 ± 0,08	16,99 ± 0,67	3,03 ± 0,01	17,01 ± 0,66	13,62 ± 1,04
Blanco	76,34 ± 0,97	-0,61 ± 0,04	10,35 ± 0,16	3,08 ± 0,00	10,37 ± 0,17	0,00 ± 0,00

Si se analiza cada coordenada y atributo de color, se puede confirmar que la especie *Nannochloropsis gaditana* presenta mayor luminosidad ( $L^*$ ) y menos diferencia de color con respecto a la masa madre normal; la especie *Tetraselmis suecica* muestra los valores más altos de  $a^*$  y los más bajos de  $b^*$ ,  $h^*$  y  $C^*$ ; la especie *Scenedesmus almeriensis* manifiesta los valores más bajos de  $a^*$ , los más altos de  $b^*$ ,  $h^*$ ,  $C^*$  y diferencia de color con respecto a la masa madre normal. Por último la especie *Isochrysis galbana* presenta valores intermedios entre todas las muestras. (El análisis estadístico completo se muestra en el Anexo 3).

Para poder observar donde se sitúan las muestras en el espacio de color CIE  $L^*a^*b^*$ , se utilizaron los gráficos que se muestran en la figura 13.



**Figura 13.-** Representación del plano  $C^*$  vs  $L^*$  (izquierda) y en el plano  $a^*$  vs  $b^*$  (derecha) de las masas madres en base a los resultados.

Donde se contempla que las masas madres con microalgas se encuentran en los valores de  $a^*$  negativo (verde), excepto para *Tetraselmis suecica* que presenta valores de  $a^*$  positivo (rojo) muy cercanos al 0. Además todas ellas se sitúan en el  $b^*$  positivo (amarillo), con proporciones de tono entre amarillo y verde, y una saturación (pureza) bastante baja.

#### 4.1.3. Viscosidad

La viscosidad es una característica que presentan los fluidos en movimiento al mostrar una oposición del flujo ante la aplicación de una fuerza. La masa madre se puede considerar como fluido alimentario ya que al ejercer una determinada fuerza, se provoca flujo del mismo y por tanto una deformación permanente. Como consecuencia de la resistencia a la fricción que



dicho fluido en movimiento opone al esfuerzo, se genera un gradiente de velocidad. Es por lo que al relacionar el gradiente con el esfuerzo aplicado, se puede obtener la viscosidad.

En la tabla 6 se pueden observar las medias y desviaciones estándar que se obtuvieron al realizar la medición de viscosidades a diferentes velocidades, siendo destacable el aumento de viscosidad al introducir microalgas a la masa madre normal.

**Tabla 6.-** Resultados del estudio de la viscosidad con las diferentes formulaciones de masa madre.

	Media $\pm$ desviación estándar
	Viscosidad (cP)
ISO	35412 $\pm$ 8181
TETRA	20793 $\pm$ 7091
SA	24486 $\pm$ 9098
NANNO	20515 $\pm$ 1302
Blanco	16953 $\pm$ 1296

Para poder determinar diferencias significativas entre muestras, se escogieron los datos obtenidos para el usillo L4 y gradiente de velocidad 20 rpm. Con estos se realizó una comparación de varias muestras (Anexo 4), donde al realizar una ANOVA y pruebas de múltiples rangos se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre todas las muestras de masa madre, siendo la microalga que más difiere estadísticamente con respecto al blanco, y por tanto que más viscosidad confiere a la masa madre, la *Isochrysis galbana*.

#### 4.1.4. Microbiología

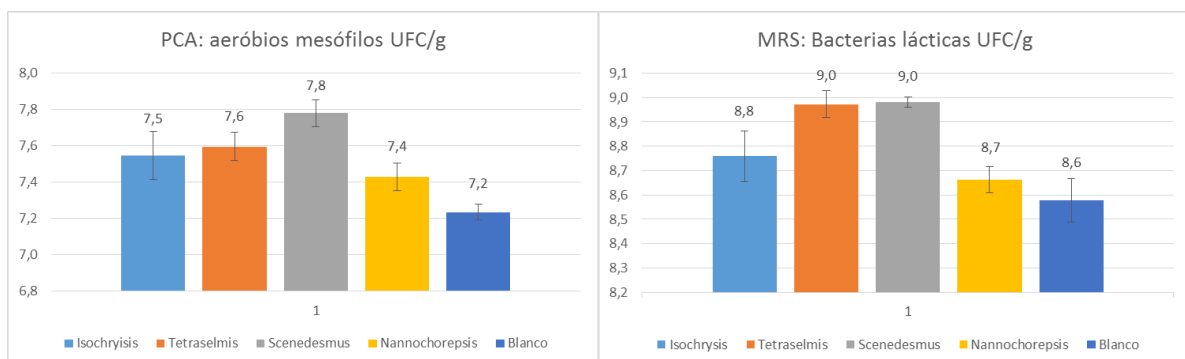
Los microorganismos presentes en la masa madre panaria son muy importantes, ya que son los encargados de llevar a cabo los procesos fermentativos que ocurren durante la realización del pan y además provocan la textura y sabor característicos del mismo.

En la tabla 7 se proporcionan las medias y desviación estándar que se obtuvieron al realizar el recuento en placa de microorganismos para cada tipo de medio utilizado. (Análisis estadístico completo en el Anexo 5).

**Tabla 7.-** Resultados del recuento en placa de los microorganismos presentes en las diferentes formulaciones de masa madre.

	UFC/g Media $\pm$ desviación estándar		
	PCA Aeróbios mesófilos	MRS Bacterias lácticas	Sabouraud Mohos y levaduras
ISO	7,5 $\pm$ 0,1	8,8 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,0
TETRA	7,6 $\pm$ 0,1	9,0 $\pm$ 0,1	6,8 $\pm$ 0,1
SA	7,8 $\pm$ 0,1	9,0 $\pm$ 0,0	6,8 $\pm$ 0,0
NANNO	7,4 $\pm$ 0,1	8,7 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 0,1
Blanco	7,2 $\pm$ 0,0	8,6 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,1

Para el caso del recuento de microorganismos aeróbios mesófilos en Plate Count Agar (PCA), la figura 14 (izquierda) muestra las diferencias entre las muestras de masas madres utilizadas, y donde con el análisis estadístico se pueden observar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre todas las masas madres excepto entre las masas con *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis gaditana*, e *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis suecica*, siendo *Scenedesmus almeriensis* la especie que más favorece el crecimiento de aeróbios mesófilos en la masa madre con un crecimiento significativo en comparación con la masa madre normal, aunque todas las especies favorecen el crecimiento significativamente.



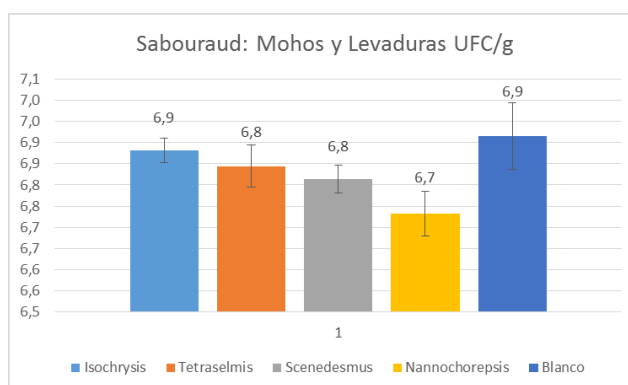
**Figura 14.-** Gráfica de barras que representa el crecimiento de los aeróbios mesófilos (izquierda) y bacterias lácticas (derecha) en cada tipo de masa madre.

El recuento de bacterias lácticas en medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS), que queda representado en la figura 14 (derecha), es mayor que los aeróbios mesófilos, cosa poco común, ya que dichos microorganismos engloban a las bacterias lácticas. Esto se puede justificar debido a que la gran cantidad de aeróbios mesófilos que presentan las masas madres (con o sin microalgas), hace que en el medio PCA no se puedan desarrollar en totalidad todas las bacterias lácticas que estas contienen al desarrollarse además otras especies de microorganismos.

Se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre todas las muestras, excepto entre las masas con *Isochrysis* y *Nannochloropsis*, *Scenedesmus* y *Tetraselmis*, y *Nannochloropsis* y

masa madre normal. Donde se puede destacar un crecimiento significativo de bacterias lácticas en comparación con la masa madre normal al incorporar las especies *Isochrysis galbana*, *Scenedesmus almeriensis* y *Tetraselmis suecica* (sobre todo en estas dos últimas).

Por último, para el caso del análisis estadístico de las unidades formadoras de colonias de Mohos y Levaduras en medio Sabouraud (figura 15) no se contemplan diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las masas madres con *Isochrysis* y *Tetraselmis*, *Scenedesmus* y *Tetraselmis*, e *Isochrysis* y masa madre normal, por lo que entre las demás especies sí se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Además se puede destacar que la incorporación de la especie *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis suecica* y *Scenedesmus almeriensis* a la masa madre resulta de un crecimiento significativamente menor que en el caso de la masa madre normal.



**Figura 15.-** Gráfica de barras que representa el crecimiento de mohos y levaduras en cada tipo de masa madre.

Para finalizar el presente apartado se puede afirmar que la introducción de microalgas a la masa madre elaborada de manera tradicional, produce un aumento en el crecimiento de los microorganismos aeróbios mesófilos y bacterias lácticas, en cambio se observa que la masa madre normal presenta mayor cantidad de mohos y levaduras en comparación con las masas que contienen microalgas.

Todos estos resultados se contrastaron con el artículo “Fermentación sólida en masas de trigo usadas en panificación” de Vázquez et al. 2001, donde se pueden observar semejanzas en los recuentos finales, y por tanto, se concluyen unos buenos resultados.

#### 4.2. Análisis del pan

Una vez comentados los resultados de los análisis realizados para las masas madres, en el siguiente apartado se pasa a examinar los resultados para los panes elaborados a partir de las

masas madres. Muchos de los análisis son comunes con los anteriores, pero en el caso del pan se evalúa además la textura, el tamaño de alveolo formado y un análisis sensorial con catadores.

#### 4.2.1. Actividad de agua, Humedad, pH y Acidez

Los siguientes parámetros se analizaron para el caso de las masas madre, es por lo que se decidió repetirlos para el pan, añadiendo además un análisis del grado de acidez que viene correlacionado con el pH del alimento.

Tanto para el caso de la aw como el grado de acidez de los panes con y sin microalgas, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Para el análisis de humedad solo se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el pan elaborado con masa de *Isochrysis galbana* y el de *Nannochloropsis gaditana*.

Sin embargo, en el pH se hallaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el pan blanco y con *Nannochloropsis*, de *Isochrysis* y de *Nannochloropsis*, y de *Scenedesmus* y de *Nannochloropsis*. Siendo por tanto la especie *Nannochloropsis gaditana* la que provoca diferencias significativas de pH en comparación con los demás panes.

En la tabla 8 se muestra un resumen de las diferentes medias y desviaciones estándar de los panes elaborados (se encuentra el análisis estadístico en el Anexo 6).

**Tabla 8.-** Resultados de aw, humedad, pH y grado de acidez para las diferentes formulaciones de panes estudiados.

	Media $\pm$ desviación estándar			
	aw	Humedad (%)	pH	Grado de acidez (mL/g)
ISO	0,9518 $\pm$ 0,0007	31,7 $\pm$ 2,2	10,11 $\pm$ 0,15	0,53 $\pm$ 0,02
TETRA	0,9513 $\pm$ 0,0038	33,6 $\pm$ 0,8	10,32 $\pm$ 0,17	0,51 $\pm$ 0,02
SA	0,9532 $\pm$ 0,0028	34,4 $\pm$ 2,3	10,17 $\pm$ 0,07	0,50 $\pm$ 0,03
NANNO	0,9528 $\pm$ 0,0030	35,0 $\pm$ 1,7	10,58 $\pm$ 0,12	0,51 $\pm$ 0,07
Blanco	0,9492 $\pm$ 0,0051	33,4 $\pm$ 1,2	10,23 $\pm$ 0,23	0,54 $\pm$ 0,04

Del presente apartado se puede comentar que resultados con tan pocas diferencias significativas entre muestras se debe a que las masas panarias han pasado por un proceso de horneado, provocando que en el caso de la actividad de agua y humedad, las partículas libres de agua se evaporen al ocurrir un aumento de temperatura notable. El grado de acidez tampoco presenta diferencias significativas, debido probablemente a las reacciones de Maillard y caramelización de azúcares que se desarrollan durante el horneado. Los resultados obtenidos de humedad y de acidez se encuentran dentro de la cantidad máxima exigida por la RTS del pan, y la aw junto con la humedad presentan valores del mismo orden a los publicados en el estudio de Curti et al., 2014.

#### 4.2.2. Color

Debido al proceso de horneado, comentado en el apartado anterior, al que se somete la masa panaria, resulta interesante analizar, tanto para la corteza como para la miga, el color y la textura que poseen cada una de ellas. El pan presenta claras diferencias en estas dos partes distintas; siendo la corteza la parte más dura, crujiente y con color pardeado (reacciones de Maillard y caramelización), en cambio la miga del pan siempre resulta más blanca y con color más claro.

En este apartado se habla sobre el color, que como en el caso de la masa madre, siempre se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al blanco, debido a los pigmentos verdes de la clorofila de las microalgas, por lo que se establece como dato de referencia para calcular las diferencias de color.

La tabla 9 muestra las medias y desviaciones estándar obtenidas para las coordenadas y atributos de color, en el caso de los análisis realizados en la corteza.

**Tabla 9.-** Resultados de coordenadas y atributos de color para la corteza de los diferentes panes estudiados.

	Media $\pm$ desviación estándar (Corteza)					
	L*	a*	b*	h*	C*	$\Delta E$
ISO	64,45 $\pm$ 2,09	0,93 $\pm$ 0,39	27,04 $\pm$ 1,23	0,03 $\pm$ 0,01	27,06 $\pm$ 1,24	9,83 $\pm$ 2,15
TETRA	62,00 $\pm$ 1,82	3,08 $\pm$ 0,40	24,82 $\pm$ 1,17	0,12 $\pm$ 0,01	25,01 $\pm$ 1,21	11,42 $\pm$ 1,92
SA	59,17 $\pm$ 1,31	0,87 $\pm$ 0,23	28,27 $\pm$ 1,10	0,03 $\pm$ 0,01	28,72 $\pm$ 1,09	15,27 $\pm$ 1,40
NANNO	66,07 $\pm$ 1,59	1,53 $\pm$ 0,32	23,67 $\pm$ 1,34	0,06 $\pm$ 0,01	23,72 $\pm$ 1,33	7,43 $\pm$ 1,55
Blanco	73,25 $\pm$ 0,73	2,72 $\pm$ 0,40	23,20 $\pm$ 1,67	0,12 $\pm$ 0,01	23,36 $\pm$ 1,70	0,00 $\pm$ 0,00

Al realizar el análisis estadístico (Anexo 7), se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre todas las muestras, exceptuando entre: pan con *Isochrysis* y *Scenedesmus* para la coordenada a\*; pan con *Nannochloropsis* y pan blanco para la coordenada b\* y el atributo C\* (croma); y para el atributo h\* (tono) no existen diferencias significativas entre pan con *Tetraselmis* y pan blanco, y pan con *Tetraselmis* y con *Isochrysis*.

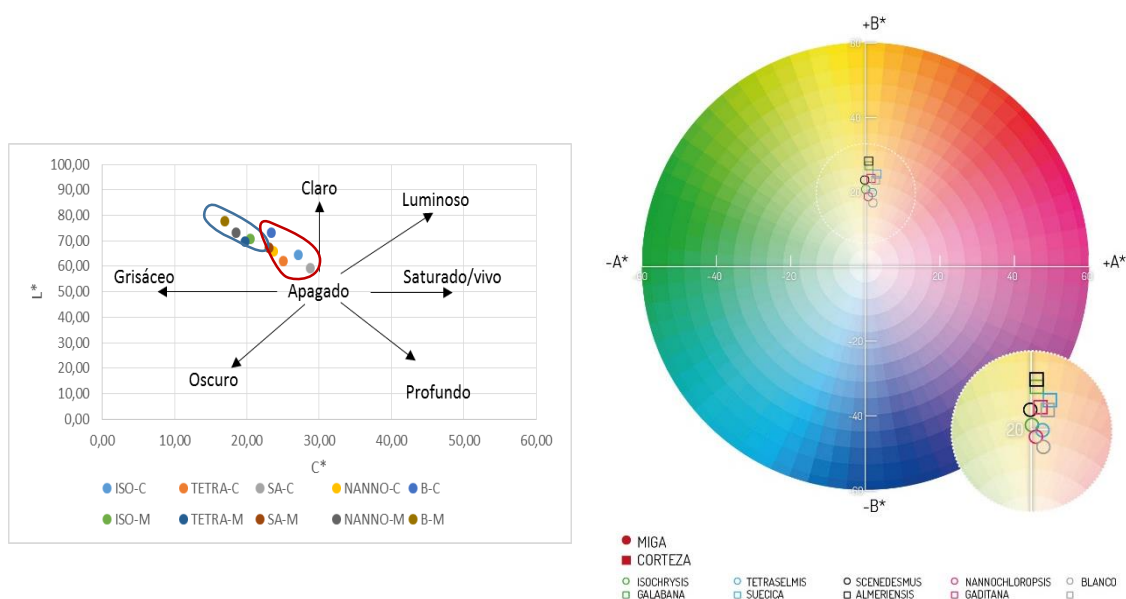
A continuación se pasa a analizar estadísticamente (Anexo 8) los resultados para el caso de la miga del pan, obteniendo valores de color no tan pardeados, puesto que no se producen reacciones de pardeamiento en esta parte del pan. Los valores de media y desviación estándar adquiridos se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10.-** Resultados de coordenadas y atributos de color para la miga de los diferentes panes estudiados.

	Media $\pm$ desviación estándar (Miga)					
	L*	a*	b*	h*	C*	$\Delta E$
ISO	70,64 $\pm$ 1,67	0,06 $\pm$ 0,18	20,48 $\pm$ 0,87	1,05 $\pm$ 1,52	20,48 $\pm$ 0,87	8,15 $\pm$ 1,66
TETRA	69,66 $\pm$ 1,00	1,80 $\pm$ 0,16	19,62 $\pm$ 0,70	0,09 $\pm$ 0,01	19,70 $\pm$ 0,71	8,46 $\pm$ 1,02
SA	67,13 $\pm$ 2,33	-0,21 $\pm$ 0,16	23,00 $\pm$ 1,31	2,78 $\pm$ 1,01	23,00 $\pm$ 1,31	12,39 $\pm$ 2,55
NANNO	73,24 $\pm$ 1,23	0,62 $\pm$ 0,17	18,43 $\pm$ 0,72	0,03 $\pm$ 0,01	18,44 $\pm$ 0,72	4,89 $\pm$ 1,28
Blanco	77,63 $\pm$ 1,06	1,96 $\pm$ 0,18	16,85 $\pm$ 0,66	0,12 $\pm$ 0,01	16,96 $\pm$ 0,67	0,00 $\pm$ 0,00

Como en el caso del color de la corteza, todas las muestras tuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre sí en relación a las coordenadas y atributos de color. Sin embargo para el atributo de color  $h^*$ , no se obtuvieron dichas diferencias ( $p > 0.05$ ) entre los panes con: *Nannochloropsis* y *Tetraselmis*, *Nannochloropsis* y blanco, y *Tetraselmis* y blanco. Para la coordenada  $L^*$  tampoco se percibieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el pan con *Isochrysis* y *Tetraselmis*.

En la figura 16 de gráficos resulta más visual la situación de los valores medios de coordenadas y atributos de color en el espacio CIE  $L^*a^*b^*$  tanto para la corteza como para la miga.



**Figura 16.-** Representación del plano  $C^*$  vs  $L^*$  (izquierda) y en el plano  $a^*$  vs  $b^*$  (derecha) de los panes en base a los resultados.

Finalmente, después de todos los resultados obtenidos y analizados, podemos observar que los panes siguen una misma pauta de color tanto para la corteza como para la miga. Así pues, los panes con mayor y menor  $b^*$ ,  $C^*$  y  $\Delta E$  son los que contienen *Scenedesmus almeriensis* y *Nannochloropsis gaditana*, respectivamente. El mayor valor de  $a^*$  se obtiene con la

incorporación de *Tetraselmis suecica* y el menor con *Scenedesmus almeriensis*. La especie que confiere mayor luminosidad al pan (corteza y miga) es *Nannochloropsis gaditana* y la que menor luminosidad proporciona es *Scenedesmus almeriensis*. En cambio, para los valores medios de  $h^*$ , la corteza y la miga no siguen la misma pauta, adquiriendo para el caso de la corteza más valor de  $h^*$  el pan con *Tetraselmis suecica* y menor valor el pan con *Scenedesmus almeriensis*; y para el caso de la miga, esta última especie es la que mayor  $h^*$  presenta en oposición a la especie *Nannochloropsis gaditana* que es la de menor valor.

#### 4.2.3. Textura

Como se ha comentado, los análisis de textura se llevaron a cabo para evaluar la calidad estructural de la corteza y de la miga en comparación con el pan blanco, y para observar o no diferencias significativas entre los panes con microalgas.

La textura está comprendida por diferentes parámetros, entre los que para el caso del pan, se han creído importantes de analizar los que se presentan en las tablas 11 y 12 con los valores de media y desviación estándar tanto para la corteza como para la miga. (Análisis estadístico completo presentado en el Anexo 9 (corteza) y Anexo 10 (miga)).

**Tabla 11.-** Resultados de parámetros de textura de la corteza en las formulaciones de pan.

	Media $\pm$ desviación estándar (Corteza)				
	Dureza (g)	Cohesividad	Elasticidad	Gomosidad (g)	Masticabilidad (g)
ISO	9346,9 $\pm$ 643,3	0,60 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,02	5663,1 $\pm$ 736,9	5272,4 $\pm$ 787,1
TETRA	8995,9 $\pm$ 638,0	0,60 $\pm$ 0,02	0,92 $\pm$ 0,01	5429,5 $\pm$ 162,5	4996,1 $\pm$ 120,7
SA	7880,3 $\pm$ 1119,9	0,61 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,03	4845,6 $\pm$ 736,4	4342,1 $\pm$ 777,8
NANNO	8448,4 $\pm$ 819,5	0,61 $\pm$ 0,02	0,94 $\pm$ 0,01	5132,4 $\pm$ 369,1	4798,5 $\pm$ 296,3
Blanco	9075,5 $\pm$ 1014,7	0,66 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,03	6016,7 $\pm$ 712,9	5387,6 $\pm$ 518,5

**Tabla 12.-** Resultados de parámetros de textura de la miga en las formulaciones de pan.

	Media $\pm$ desviación estándar (Miga)				
	Dureza (g)	Cohesividad	Elasticidad	Gomosidad (g)	Masticabilidad (g)
ISO	3450,3 $\pm$ 558,3	0,65 $\pm$ 0,01	0,93 $\pm$ 0,00	2227,8 $\pm$ 355,9	2068,8 $\pm$ 325,5
TETRA	3453,3 $\pm$ 47,9	0,66 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,00	2272,3 $\pm$ 53,8	2139,1 $\pm$ 52,9
SA	3527,8 $\pm$ 240,7	0,66 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,00	2328,3 $\pm$ 184,5	2197,5 $\pm$ 175,5
NANNO	3454,3 $\pm$ 470,5	0,64 $\pm$ 0,02	0,94 $\pm$ 0,00	2212,1 $\pm$ 335,9	2070,7 $\pm$ 308,9
Blanco	3235,6 $\pm$ 292,7	0,72 $\pm$ 0,10	0,94 $\pm$ 0,02	2315,8 $\pm$ 161,2	2183,7 $\pm$ 177,9

La dureza se define como el máximo pico de fuerza que se realiza durante el primer ciclo de comprensión, donde no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las muestras de panes tanto para la corteza como para miga.

La cohesividad se expresa como la relación entre el área positiva de fuerza durante la segunda compresión y la primera. En este caso, para los valores de corteza del pan, se encuentran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el blanco y todas las especies de microalgas utilizadas. En cambio, para los valores de la miga, solo se haya diferencias significativas entre el pan blanco y con *Nannochloropsis*.

La elasticidad está relacionada con la altura que el pan recupera durante el tiempo transcurrido entre el final de la primera compresión (o mordedura cuando introducimos el alimento a la boca) y el inicio de la segunda. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre el pan con *Nannochloropsis* y pan con *Scenedesmus* para la corteza, y entre el pan con *Isochrysis* y pan con *Scenedesmus* para la miga.

La gomosidad es una característica de los alimentos semisólidos que se define como el producto de la dureza por la cohesividad. Para los panes elaborados solo se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la corteza del pan con *Scenedesmus almeriensis* y el pan blanco.

Por último, la masticabilidad se define como el producto de la gomosidad por la elasticidad. Es medida en términos de la energía requerida para masticar un alimento sólido. Como para el caso de la gomosidad solo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre la corteza del pan con *Scenedesmus almeriensis* y el pan blanco.

A modo resumen del presente apartado, se puede afirmar que los panes elaborados con las diferentes especies de microalgas no presentan diferencias estadísticamente significativas importantes en comparación con el pan blanco de consumo habitual. Solo se encontrarían diferencias en la cohesividad, por lo que estos resultados son buenos de cara a una aceptación de calidad textural en el mercado del pan.

#### 4.2.4. Estudio de imagen del alveolo

Una característica muy importante del pan es la formación de  $\text{CO}_2$  a partir de los microorganismos que se encuentran en la masa madre, éstos consumen los azúcares que contiene la masa panaria y producen  $\text{CO}_2$ . Un pan con gran cantidad de alveolo es el resultado de una actividad microbiana notable, donde también influye la cantidad de azúcares disponibles y la calidad del gluten presente en la harina, ya que éste es el encargado de la formación de la red tridimensional que contiene el  $\text{CO}_2$ .

Se realizó un análisis estadístico (Anexo 11) para los valores de porosidad obtenidos, de los cuales las medias y desviaciones estándar se muestran en la tabla 13. No se observaron



diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ) entre las muestras de pan con microalgas y pan normal.

**Tabla 13.-** Resultados de la porosidad evaluada para las formulaciones de pan.

	Media $\pm$ desviación estándar		
	Area total (cm)	Area sin poros (cm)	Porosidad %
ISO	18,7 $\pm$ 1,1	15,6 $\pm$ 1,7	16,7 $\pm$ 5,3
TETRA	16,9 $\pm$ 1,9	13,7 $\pm$ 1,7	19,3 $\pm$ 3,1
SA	16,4 $\pm$ 1,6	13,4 $\pm$ 1,8	18,3 $\pm$ 4,1
NANNO	15,8 $\pm$ 1,3	13,5 $\pm$ 1,3	14,7 $\pm$ 1,7
Blanco	15,7 $\pm$ 0,3	13,7 $\pm$ 0,8	12,5 $\pm$ 4,3

Se puede confirmar, que de igual modo que para los resultados de textura del apartado anterior, la incorporación de microalgas al pan no influye en los alveolos que se forman al horneado en comparación con los de un pan blanco, aunque las bacterias lácticas que se desarrollan en la masa madre con microalgas tengan mayor crecimiento que en la masa madre normal.

#### 4.2.5. Sensorial

Es muy importante saber la aceptación por parte de los consumidores de pan habitual que presenta el pan diseñado en el presente proyecto, debido a todas sus peculiaridades en la formulación y elaboración del mismo.

El análisis estadístico realizado para la evaluación de los resultados obtenidos de la cata de panes con microalgas fue satisfactorio. En la tabla 14 se muestran los valores de media y desviación estándar para cada propiedad evaluada del 1 al 9, excepto la intención de compra donde el 1 es sí y el 2 no, por parte del panel de catadores en relación con los 4 panes.

**Tabla 14.-** Resultados de cada atributo sensorial para las diferentes formulaciones de pan.

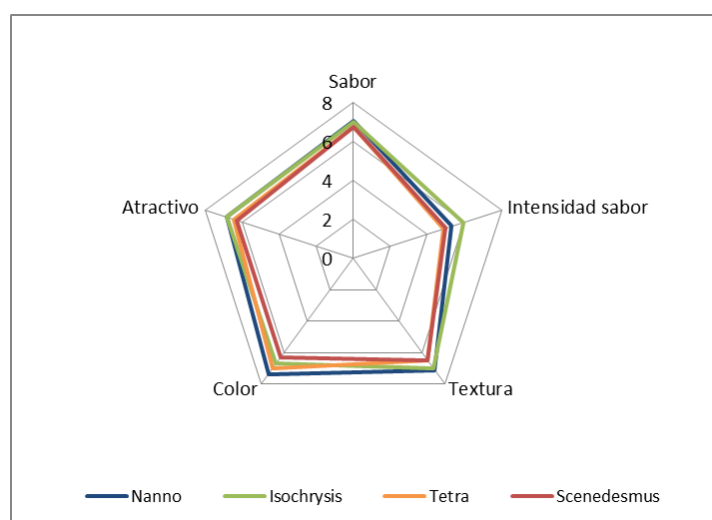
	Media $\pm$ desviación estándar					
	Sabor	Intensidad de sabor	Textura	Color	Atractivo	Intención de compra
ISO	6,9 $\pm$ 1,5	5,9 $\pm$ 1,5	7,0 $\pm$ 1,3	6,7 $\pm$ 1,7	6,8 $\pm$ 1,3	1,2 $\pm$ 0,4
TETRA	6,7 $\pm$ 1,5	4,9 $\pm$ 1,9	6,5 $\pm$ 1,5	6,9 $\pm$ 1,5	6,5 $\pm$ 1,4	1,3 $\pm$ 0,5
SA	6,7 $\pm$ 1,8	5,0 $\pm$ 1,7	6,5 $\pm$ 1,8	6,3 $\pm$ 1,8	6,3 $\pm$ 1,6	1,4 $\pm$ 0,5
NANNO	7,1 $\pm$ 1,3	5,3 $\pm$ 1,6	7,1 $\pm$ 1,3	7,4 $\pm$ 1,4	6,8 $\pm$ 1,3	1,2 $\pm$ 0,4

No se obtuvieron diferencias significativas muy notables al comparar los atributos cuestionados para los panes con microalgas. En el anexo 1 se adjunta el cuestionario a realizar

por los diferentes catadores, seguido los sabores que observaban en los panes y del análisis estadístico.

Solo se debe destacar las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) obtenidas para el caso de la intensidad de sabor entre el pan con *Isochrysis* y con *Scenedesmus*, y entre el pan con *Isochrysis* y con *Tetraselmis*. También se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con lo que respecta al color, entre el pan con *Nannochloropsis* y con *Scenedesmus*, y pan con *Tetraselmis* y con *Scenedesmus*. Por último comentar que, en la intención de compra por parte de los catadores, se encuentran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el pan con *Isochrysis* y el pan con *Scenedesmus*, siendo el pan de esta última especie de microalga el que menos comprarían los catadores en relación con el pan con *Isochrysis*.

A continuación en la figura 17 de gráfica de araña se representan los diferentes atributos evaluados por los catadores de manera más visual.



**Figura 17.-** Puntuaciones de la cata de los distintos atributos sensoriales para las cuatro formulaciones elaboradas de pan con microalgas.

Con este análisis sensorial se puede observar la aceptación por parte de los catadores cuestionados, siendo los panes elaborados a partir de masa madre con *Isochrysis galbana* y con *Nannochloropsis gaditana* los mejor evaluados.

Además, los resultados obtenidos se correlacionan perfectamente con los que se analizan de manera objetiva (mediante equipos), como es el caso de la textura. Los catadores no encuentran diferencias texturales entre los panes que evalúan correspondiendo con los datos a modo global de dicho parámetro analizado en el apartado 4.2.3. Para el caso del color, solo se evaluó si lo encontraban aceptable, por lo que al analizar diferencias de color entre las muestras, como en el caso de los análisis objetivos realizados por el equipo utilizado, no se pueden correlacionar los resultados.

## Capítulo 5. Conclusiones

## 5. CONCLUSIONES

Una conclusión a modo global del presente trabajo es la satisfactoria introducción de microalgas a los panes elaborados a partir de masa madre con incorporación de las mismas, ya que se obtienen resultados que, aunque difieran con la masa madre o el pan normal, no influyen en las propiedades finales de calidad del pan según el BOE.

En lo que respecta a las características físico-químicas de las masas madre, se concluye que la introducción de la especie de microalga *Isochrysis galbana* a éstas destaca frente a las demás especie. La masa madre con *Isochrysis* produce un descenso significativo de la aw, humedad y pH en comparación a los resultados obtenidos de la masa madre normal. Además también provoca un aumento significativo con respecto a la viscosidad de las masas. También es importante afirmar el aumento significativo tanto de los aerobios mesófilos como de las bacterias lácticas al incorporar microalgas, destacando la especie *Scenedesmus almeriensis*. Al contrario se produce un descenso de los mohos y levaduras que se encuentran en las masas madres con microalgas en comparación con la normal. Por último, con lo que respecta al color, la única conclusión que podemos confirmar es el desplazamiento hacia los colores verdes, excepto de *Tetraselmis suecica* (marrones), con respecto a la masa madre normal.

Pasando a concluir los resultados con respecto al pan elaborado, todos los resultados obtenidos de los parámetros evaluados (aw, humedad, pH, grado de acidez, textura y porosidad), no hacen más que poner de manifiesto que la incorporación de microalgas al pan no muestran unas diferencias significativas en comparación a los panes normales, siendo todos los resultados muy satisfactorios en relación a los obtenidos para un pan común y a la legislación de panes especiales. El color es la propiedad que difiere significativamente dando un color característico a éstos.

Del análisis sensorial se obtuvieron muy buenos resultados, destacando como mejor valorados a modo general, los panes con las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis gaditana*.

Finalmente, serían interesantes futuros estudios en relación al estudio de la evolución del crecimiento de los microorganismos, presentes en la masa madre con microalgas desde el inicio de su elaboración hasta observar un crecimiento constante. Ya que al realizar el análisis microbiológico, se observaron diferencias significativas con respecto a la flora de una masa madre sin adición de microalgas.

## Capítulo 6. Bibliografía

## 6. BIBLIOGRAFIA

BATISTA, A.P.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, N.M.; FRANCO, J.M.; RAYMUNDO, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2: 164-173.

BECKER, E. WOLFGANG. (1995). *Microalgae: Biotechnology and microbiology*. Editorial Cambrige: Cambrige University. Serie: Cambrige studies in biotechnology.

BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO (BOE) (1984). Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, circulación y comercio del pan y panes especiales nº 146.

CURTI, E.; CARINI, E.; BOCACINI, G.; TRIBUZIO, G.; VITTADINI, E. (2013). Effect of the addition of bran fractions on bread properties. *Journal of Cereal Science*, 57: 325-332.

DEL CASTILLO CARRILLO, L.; HERNÁNDEZ MÁRQUEZ, J.; FERNÁNDEZ MARTÍNEZ, D.; HERNÁNDEZ, J.M.; TOROTOSA EGEA, A.; GALINDO CUENCA, A. (2010/2011). Microalgas en alimentación. *I Certamen de Proyectos educativos en Ingeniería química, Universidad de Almería*. Págs. 48-51.

DE LA JARA VALIDO, A.; PORTILLO HAHNEFELD, E.; CLEMENTE JANERIO ASSUNÇÃO, P.; FREIJANES PRESMANES, K.; CARMONA DUARTE, L.; MENDOZA GUZMAN, H. (2013). Microalgas y snacks, un futuro conjunto. *Tecnifood. La revista de la tecnología alimentaria*, Septiembre/Octubre: 56-59.

DE LA JARA VALIDO, A.; PORTILLO HAHNEFELD, E.; MENDOZA GUZMÁN, H.; FREIJANES PRESMANES, K.; CLEMENTE JANEIRO ASSUNÇÃO, P.; CARMONA DUARTE, L. (2014). Proyecto Alimento: Explotación comercial de microalgas. *Alimentaria: Investigación, Tecnología y Seguridad*, 450: 92-96.

FEDERACIÓN CHILENA DE INDUSTRIALES PANADEROS, visto el 30 de abril del 2015. [http://www.fechipan.cl/historia\\_del\\_pan.html](http://www.fechipan.cl/historia_del_pan.html)

FRADIQUE, M.; BATISTA, A.P.; NUNES, M.C.; GOUVEIRA, L.; BANDARRA, N.M.; RAYMUNDO, A. (2013). Isochrysis galbana and Diacronema vlkianum biomass incorporation in pasta products as PUFA's source. *LWT-Food Science and Technology*, 50: 312-319.

FUNDACIÓN CAJAMAR, ESTACIÓN EXPERIMENTAL. (2012). *Nueva especie de microalga Scenedesmus almeriensis*. Universidad de Almería, visto 2 Mayo de 2015. [http://cms.ual.es/idc/groups/public/@serv/@otri/documents/documento/documento182dos\\_sierteconolgico.pdf](http://cms.ual.es/idc/groups/public/@serv/@otri/documents/documento/documento182dos_sierteconolgico.pdf)

GOUVEIA, L.; BATISTA, A.P.; MIRANDA, A.; EMPIS, J.; RAYMUNDO, A. (2007). *Chlorella vulgaris* biomass used as colouring source in traditional butter cookies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 433-436.

GOUVEIA, L.; BATISTA, A.P.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A.; BANDARRA, N.M. (2008). Microalgae in Novel Food Products. *Food Chemistry Research Developments*, chapter 2.

GOUVEIA, L.; COUTINHO, C.; MENDONÇA, E.; BATISTA, A.P.; SOUSA, I.; BANDARRA, N.M.; RAYMUNDO, A. (2008). Functional biscuits with PUFA- $\omega$ 3 from *Isochrysis galbana*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 891-896.

JEKLE, M.; BECKER, T. (2012). Effects of Acidification, Sodium Chloride, and Moisture levels on Wheat Dough: II. Modeling of Bread Texture and Staling Kinetics. *Food Biophysics*, 7: 200-208.

KADAM S.U.; PRABHASANKAR, P. (2010). Marine Foods as functional ingredients in bakery and pasta products. *Food Research international*, 43: 1975-1980.

KOLLER, M.; MUHR A.; BRAUNEGG, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, 6: 52-53.

LUBIAN, L.M. (1982). *Nannochloropsis gaditana* sp.nov., una nueva *Eustigmatophyceae* marina. *Lazaroa*, 4: 287-293.

MERCASA, MARTÍNEZ CERDEÑO, J.M. (2011). Consumo de pan en España. *Alimentación en España, Distribución y Consumo*, Enero-Febrero 2011.

MOLINO GRIMA, E. (2006). *Production of Microalgae biomass (Scenedesmus almeriensis) in a farmer*. Departamento de ingeniería química. Universidad de Almería.

PICÓ SEGURA, C.; FONT PÉREZ, G.; LORENTE TOLEDANO, A.; PALOV OLIVER, A.; RAMÓN VIDAL, D.; BECERRIL MORAL, C. (2013). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a una solicitud de evaluación inicial para la comercialización de la microalga marina *Tetraselmis chuii* en el marco del Reglamento (CE) nº 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. *Revista del comité científico*, 18: 11-27.

RODRIGUEZ DE MARCO, E.; STEFFOLANI, M.E.; MARTÍNEZ, C.S.; LEÓN, A.E. (2014). Effects of *Spirulina* biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. *LWT-Food Science and Technology*, 58: 102-108.

SADOVSKAYA, I.; SOUISSI, A.; SOUISSI, S.; GRARD, T.; LENCEL, P.; GREENCE, C.M.; DUIN, S.; DMITRENOK, P.S.; CHIZHOV, A.O.; SHASHKOV, A.S.; USOV, A.I. (2014). Chemical structure and biological activity of a highly branched (1-3, 1-6)- $\beta$ -D-glucan from *Isochrysis galbana*. *Carbohydrate Polymers*, 111: 139-148.

SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P-Y.; VACA-GARCIA, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35: 265-278.

SZABO, N.J.; MATULKA, R.A.; KISS, L.; LICARI, P. (2012). Safety evaluation of a high lipid whole algal flour (WAF) from *Chlorella protothecoides*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 63: 155-165.

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROALGAS Y SUBPRODUCTOS, visto el 30 de abril de 2015. <http://www.seaweed.es/productos/>

VÁZQUEZ, L.; CHÁVEZ; MADRID, M. (2001). Fermentación sólida en masas madre de trigo usadas en panificación. Actas IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. CXIII-1. Visto 29 de enero de 2015. Acceso on-line: [http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA\\_XIII/CXIII-1.pdf](http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_XIII/CXIII-1.pdf)

VIZCAÍNO, A.J.; LÓPEZ, G.; SÁEZ, M.I.; JIMÉNEZ, J.A.; BARROS, A.; HIDALGO, L.; CAMACHO-RODRIGUEZ, J.; MARTÍNEZ, T.F.; CERÓN-GARCÍA, M.C.; ALARCÓN, F.J. (2014). Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture*, 431: 34-43.

