

ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA RESPUESTA A CONDICIONES DE ESTRÉS EN LACTOBACILOS HETEROFERMENTANTES DE INTERÉS TECNOLÓGICO

Tatiana Bochatay

Tesinista de Licenciatura en Biotecnología. Facultad de Ingeniería Química – Instituto de Lactología Industrial, INLAIN (CONICET-UNL). PICT N° 2010-0138. dtatajang@yahoo.com.ar

Palabras claves: lactobacilos heterofermentantes – caracterización tecnológica - estrés

Área temática: Ingenierías

Sub-área: Alimentos

INTRODUCCIÓN

La implementación de nuevas cepas de *Lactobacillus* como posibles *starters* en algún proceso industrial requiere de una detallada caracterización en diversos aspectos básicos entre los que se encuentra el estudio de la resistencia a procesos de estrés (Cardamone y col., 2011, Sanchez y col., 2015). En esta investigación se trabajó con un grupo de lactobacilos heterofermentantes obligados (LHeo) evaluándose su crecimiento en medios de concentraciones salinas elevadas o de pH extremo, su viabilidad celular y actividad acidificante posterior al proceso de congelamiento como método de conservación, como así también su capacidad de resistir a un tratamiento térmico moderado.

El presente trabajo es la continuación de investigaciones iniciadas en 2012 sobre un grupo de cepas de LHeo aisladas de muestras lácteas provenientes de plantas regionales que presentaban defectos gasógenos. Dicho grupo ha sido caracterizado fenotípicamente y genotípicamente y 16 cepas representativas del conjunto ya han sido identificadas. En este trabajo esas cepas se ponen a prueba ante distintas condiciones de *estrés* para caracterizarlas tecnológicamente y evaluar su incorporación a posibles aplicaciones.

OBJETIVOS

- Evaluar el desempeño de 16 cepas de lactobacilos heterofermentantes obligados frente a situaciones de estrés tecnológico.
- Seleccionar entre las cepas estudiadas aquellas que muestren mejores aptitudes tecnológicas para ser utilizadas en procesos industriales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas fueron seleccionadas en una etapa de caracterización fenotípica y genotípica previa. Son 16 cepas de LHeo identificadas como: *Lactobacillus fermentum* (12), *Lactobacillus brevis* (2), *Lactobacillus buchneri* (1) y *Weissella cibaria* (1). A lo largo de este informe se nombrarán como Grupo A a las cepas de *L. fermentum* (18, 19, 22, 27, 37, 38, 46, 49, 52, 59, 65 y 68) y como Grupo B (20, 39, 61 y 66) a las cepas de las tres especies restantes. Las mismas fueron cultivadas en caldo de *Man Rogosa and Sharpe* (MRS, Biokar, Francia) a sus temperaturas óptimas, T_{opt} (37°C Grupo A y 30°C Grupo B).

Tolerancia a la sal y a la acidez

Se evaluó el desarrollo en caldo MRS suplementado con NaCl (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina) a 2 y 4% p/v (Cardamone y col, 2011). Cultivos *overnight* (O.N.) de las células fueron lavadas dos veces (*buffer* fosfato de potasio 10 mM pH 7) suspendidas e inoculadas

Autora: Bochatay, Tatiana

Directora: Capra, M. L.

Co-Directora: Quiberoni, A.

(2% v/v) en cada medio e incubadas a T_{opt} (baño termostatzado) por 24 h. El desarrollo se determinó en espectrofotómetro (Lambda 25, Perkin Elmer) a 560 nm ($D.O._{560}$), contra cultivos en caldo MRS sin NaCl (control).

En forma análoga se estudió el crecimiento en medio acidificado (caldo MRS pH 3, 4, 5 y 6 ajustado con ácido láctico, Cicarelli, San Lorenzo, Argentina) usando como control cultivos desarrollados en caldo MRS sin ajuste de pH (aproxim. pH 6,4). Los resultados se expresaron en ambas experiencias como la relación porcentual entre los valores de $D.O._{560}$ MRS modificado y $D.O._{560}$ MRS control.

Tolerancia térmica

A fin de diferenciar entre cepas en su resistencia térmica, se evaluó su capacidad de sobrevivir a un tratamiento moderado según Ferrando (2014), con algunas modificaciones. Cultivos en estado estacionario temprano de las células se lavaron dos veces (*buffer* fosfato de potasio 10mM pH 7), se suspendieron en el *buffer* y se trataron 63°C-15 min (baño termostatzado) y se enfriaron en baño de hielo. Recuentos microbiológicos de las suspensiones celulares antes (control) y después del tratamiento se realizaron en MRS agarizado y se incubaron (48 h) en microaerofilia a la T_{opt} correspondiente a cada grupo. Los resultados se expresaron como log UFC/ml.

Viabilidad y recuperación de cultivos conservados congelados

Se evaluó la viabilidad celular y su recuperación posterior a su conservación por congelamiento según Sanchez y col. (2005). Cultivos en estado estacionario temprano inoculados (10%) en leche descremada reconstituida estéril (10% p/v, LDR) con sacarosa (6% p/v) -como crioprotector- fueron congelados a -20°C. En los descongelados (24 h, 20, 40 y 60 días) se determinó viabilidad celular por recuento (MRS agarizado, 48 h, microaerofilia, T_{opt}). La recuperación se evaluó según la capacidad acidificante en LDR (10% p/v) con extracto de levadura (EL, 0,5% p/v) y glucosa (Glu, 0,5% p/v), inoculando (10%) el cultivo descongelado e incubando a T_{opt} (4 h, baño termostatzado). Se midió pH al inicio y al final de la incubación. La recuperación se definió según la expresión:

$$Recuperación = \frac{\Delta pH_{t=x}}{\Delta pH_{t=0}}$$

Donde ΔpH es la variación entre el pH inicial y final luego de su incubación en LDR-EL-Glu para el cultivo sometido a congelamiento ($\Delta pH_{t=x}$, donde x es el periodo de congelamiento) y para el cultivo control sin congelar ($\Delta pH_{t=0}$, cultivo a tiempo cero).

RESULTADOS

El estudio de la capacidad de un cultivo de tolerar y/o desarrollar en presencia de sal o en medio ácido aporta a la selección de cepas que resultarían más adecuadas para participaren la manufactura de alimentos fermentados que presenten acidez y elevado contenido de sal. Respecto a la **tolerancia a la sal** (Fig.1 (a)), las cepas desarrollaron a las 2 concentraciones ensayadas. Dentro del Grupo A la magnitud de afectación del crecimiento a distintas concentraciones salinas es variable: con máximas diferencias (cepas 19 y 22) o donde no influye el aumento de concentración de NaCl de 2 a 4% (cepas 37 y 46). En general, todo el conjunto (grupos A y B) mostró menor crecimiento a 4% (con excepción de las cepas 39 y 52) con reducciones inferiores al 50% en los valores de $D.O.$ respecto de los controles. Sólo para la cepa 22 se estimuló el desarrollo por inclusión de NaCl (2%).

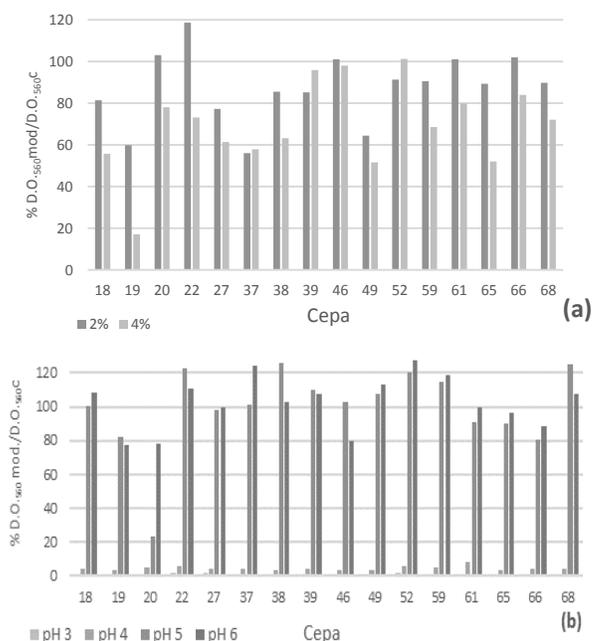


Fig.1: Efecto de la sal (a) y de la acidez (b) en el desarrollo de las cepas.

temperaturas moderadas-altas. Esa resistencia fue comparable o incluso superior a la obtenida para cepas de otras especies relacionadas (Ferrando, 2014). Las cepas de *L. brevis* mostraron diferencias en su resistencia al tratamiento aplicado, exhibiendo la cepa 61 mayor labilidad térmica. La más afectada fue la única cepa de *W. cibaria* (cepa 20), que mostró escaso desarrollo recién a las 72 h de incubación.

El análisis del **efecto producido por el**

congelamiento como modo de conservación es complejo, tanto viabilidad como capacidad acidificante de los cultivos se vieron afectados por el tratamiento. En general la viabilidad (Fig.3 (a)) fue levemente afectada (máximas reducciones de 1 orden log) importante si se piensa en una posible comercialización como cultivos congelados. En la recuperación, también se evidenció influencia ya que en ningún caso se igualó la capacidad acidificante del cultivo control. En general y considerando la recuperación de la actividad acidificante a los 60 d de congeladas, las cepas podrían clasificarse en 3 grupos: entre 0,80-1,00 (cepas 20, 22, 38, 46 y 52); entre 0,54 y 0,70 (cepas 18, 19, 27, 39, 49, 59, 61, y 68) y entre 0,17 y 0,35 (cepas 37, 65 y 66). Sin embargo y teniendo en cuenta ambos parámetros, cepas que mostraron igual pérdida de viabilidad (0,59-0,60) recuperaron la capacidad acidificante

Según los resultados del experimento **de tolerancia a la acidez** (Fig. 1 (b)), el desarrollo de todas las cepas a pH 3 y 4 se anuló casi totalmente; mientras que a pH 5 y 6 el crecimiento fue aceptable (80 – 130% respecto del control en MRS) lo cual resulta interesante si se piensa en una futura aplicación que se lleve a cabo en esa zona de acidez. La cepa de *W. cibaria* (20) mostró un comportamiento único con una marcada reducción (77%) en el desarrollo cuando fue inoculada en caldo MRS a pH 5.

El **tratamiento térmico** afectó a todas las cepas (Fig. 2), siendo en general las menos afectadas las de *L. fermentum*. Todas las cepas (excepto cepa 20) sobreviven en una concentración aceptable ($>5.10^4$ UFC/ml), importante para considerar su incorporación en procesos de elaboración que requieran

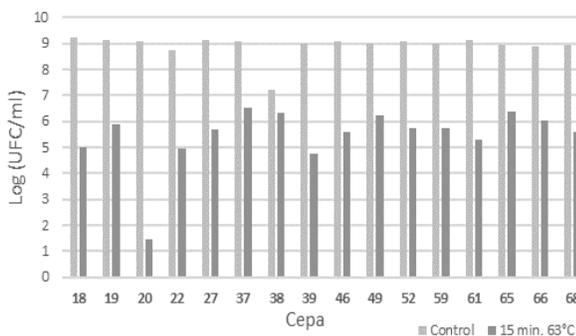


Fig. 2. Efecto del tratamiento térmico en la viabilidad celular.

en igual medida (0,86 para cepas 20 y 52) o se vio sensiblemente afectada (0,27 para la cepa 66). En un análisis análogo, cepas que mostraron recuperaciones similares (0,57-0,58) mostraron reducciones diferentes en su viabilidad (1,1 y 0,46 órdenes log para las cepas 27 y 39, respectivamente). Las dos cepas de *L. brevis* (cepas 61 y 66) mostraron diversidad de comportamientos dentro de la misma especie. La cepa 66 fue afectada en mayor magnitud por el congelamiento con reducción de 0,60 órdenes log en su viabilidad y recuperando sólo el 27% de su actividad acidificante; mientras que la cepa 61 respondió considerablemente mejor frente al congelamiento (0,26 y 64%, respectivamente).

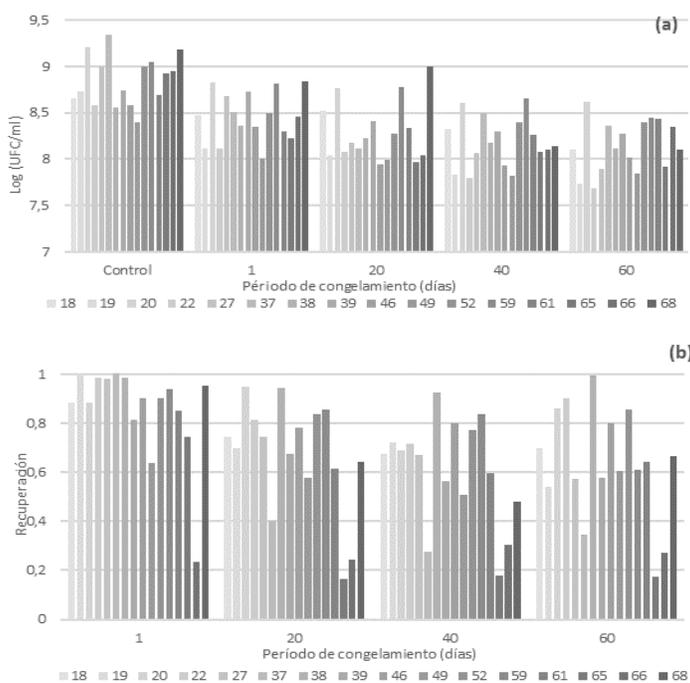


Fig.3. Influencia del congelamiento en la viabilidad (a) y en la recuperación (b) de los cultivos

CONCLUSIONES

El trabajo realizado mostró la respuesta de cada cepa a condiciones de estrés comúnmente encontradas en distintos procesos industriales. Si bien en su mayoría respondieron adecuadamente, lo hicieron en distinto grado para cada factor estudiado y eso permite detectar las cepas más robustas en su desempeño -y por tanto más apropiadas- en función del factor involucrado para un proceso particular. Especialmente, es interesante la respuesta a estrés térmico obtenida como así también el adecuado número que presentan luego de un período prolongado de conservación en frío. Respecto de esto último, se vio que no sólo es importante considerar la pérdida de viabilidad sino también su efecto sobre otros parámetros funcionales de los cultivos. Los resultados obtenidos son de gran importancia para analizar posibles aplicaciones como cultivos iniciadores para este grupo de cepas.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Cardamone L., Quiberoni A, Mercanti D.J., Fornasari M.E., Reinheimer J.A. y Guglielmotti D.M., 2011.** Adventitious dairy *Leuconostoc* strains with interesting technological and biological properties useful for adjunct starters. *Dairy Science & Technology*, 91, 457-470.
- Ferrando, V. A., 2014.** Cepas de *Lactobacillus plantarum* de interés probiótico: *stress* tecnológico y funcionalidad. Tesina de licenciatura.
- Sánchez, J.I., Martínez, B., Rodríguez, A., 2005.** Rational selection of *Leuconostoc* strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 377– 387.