

Leuconostoc en la industria de alimentos: comportamiento en condiciones de estrés tecnológico.

Joaquín Cicotello

Instituto de Lactología Industrial (Universidad Nacional del Litoral – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Facultad de Ingeniería Química, Santiago del Estero 2829, S3000AOM Santa Fe, Argentina.

Área: Ingeniería
Sub-Área: Alimentos

INTRODUCCIÓN

Leuconostoc es una bacteria láctica heterofermentante que cumple un rol muy importante en la producción de compuestos de aroma (diacetilo, alcoholes y acetoina) en productos lácteos fermentados como crema, manteca y quesos. Su función es fundamental en quesos azules, donde la producción de CO₂ permite la apertura de la pasta y el desarrollo fúngico posterior (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004; Björkroth y Holzapfel, 2006; Pogačić y col., 2016). Las bacterias constituyentes de los cultivos iniciadores (*starters*) están sometidas a distintos factores de estrés durante su preparación y / o durante el proceso de elaboración del producto final. El estudio de la respuesta a estas condiciones desfavorables es indispensable para una correcta selección de cepas al momento de proponer su uso industrial (Serrazanetti y col., 2009; De Angelis y Gobbetti, 2011), lo cual constituyó el objetivo principal de este trabajo.

METODOLOGÍA

Cepas y estudios genéticos

En este trabajo se utilizaron 29 cepas de *Leuconostoc*, comerciales y aisladas de distintos productos lácteos. Para su uso rutinario se activaron en caldo MRS (30°C - 24 h) y se almacenaron en heladera (7°C). La identificación taxonómica de las cepas se realizó mediante secuenciación de una región variable del gen 16S rARN (500 bp) y el estudio de diversidad genética por RAPD-PCR (*Random Amplification Polymorphic DNA*), usando los oligonucleótidos M13 y R5. El dendrograma se obtuvo usando el método de agrupamiento pareado no ponderado con el algoritmo de media aritmética (*Unweighted Pair-Group Method with Average Algorithm*, UPGMA), utilizando el coeficiente *r* de Pearson como medida de similitud.

Tratamientos de estrés

Las cepas se sometieron a los siguientes tratamientos de estrés: i) caldo MRS, 15 min – 55°C (choque térmico); ii) buffer sodio-lactato (1 M) pH 4, 30 min – 30°C (choque ácido); iii) buffer glicina - NaOH (0,1 M) pH 9,8, 24 h – 30°C (choque alcalino); iv) solución NaCl (30 % p/v), 24 h – 30°C (choque osmótico) y v) solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0,3 % (p / v) 30 min – 30°C (choque oxidativo) (Ferrando y col., 2015). Se obtuvieron los índices de resistencia, definidos como $IR = \log N_0 / N_f$ (N_0 = recuento inicial de células, N_f =recuento final de células). Los resultados se procesaron aplicando análisis multivariado de componentes principales (CPA), usando el *software* IBM SPSS Statistics Version 21 (IBM Corp. 2012). Sobre 12 cepas seleccionadas por su mayor resistencia, se estudió el desarrollo en condiciones sub-

Proyecto marco: "*Leuconostoc* en la industria láctea: comportamiento frente a factores de *stress* y estrategias para mejorar su desempeño tecnológico". C.A.I.+D. N° PI 501 201101 00039 LI (2013-2015). Director: Dra. Andrea Quiberoni. Tesina de Licenciatura en Biotecnología. Director del tesinista: Mg. Viviana Suárez, Co-Director: Dra. Daniela Guglielmotti.

letales de estrés según el siguiente protocolo: i) caldo MRS pH 5,0 y 5,5 (24 h - 30°C); ii) caldo MRS pH 8 (24 h - 30°C); iii) caldo MRS – NaCl 4 % (p/v) (24 h - 30°C) y iv) caldo MRS a 10°C, 24 h y 48 h. Se calculó en cada caso la tasa de crecimiento (TC), definida como $D.O._s / D.O._c \times 100$ (donde $D.O._s$ = densidad óptica de la cepa bajo condiciones de estrés y $D.O._c$ = densidad óptica del control, ambas medidas al final de la experiencia).

RESULTADOS

Estudios genéticos

Los resultados de la identificación taxonómica se muestran en la Tabla 1. La diversidad intra-especie observada por RAPD-PCR fue amplia. El dendrograma obtenido (Fig. 1) mostró 4 *clusters* (I, II, III y IV), cada uno agrupando las cepas de su misma especie. Dentro de cada *cluster*, se detectaron distintos sub-*clusters*, con similitudes que oscilaron entre 56 % y 66 % para los *clusters* I y II (*Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*, respectivamente). Los *clusters* III y IV incluyeron las cepas de *Leuconostoc lactis* y la única cepa de *Leuconostoc citreum*.

Tabla 1. Identificación taxonómica y producto de origen de las cepas de *Leuconostoc* usadas en este estudio.

Cepa	Identificación taxonómica	Origen*	Cepa	Identificación taxonómica	Origen*
<i>Ln MB7</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	QC	<i>Ln R707</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	CC
<i>Ln LT-3</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	QC	<i>Ln N17</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	QC
<i>Ln N18</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	WPC	<i>Ln N1</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	QC
<i>Ln MB8</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	QC	<i>Ln LN-B</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	LP
<i>Ln D4</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	LP	<i>Ln MB2</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	QC
<i>Ln D14</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	WPC	<i>Ln D6</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	LP
<i>Ln N4</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	QC	<i>Ln N14</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	QPS
<i>Ln N19</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	QC	<i>Ln LT-1</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	QC
<i>Ln N12</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	QSD	<i>Ln MB4</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	QC
<i>Ln D2</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	QC	<i>Ln D16</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	QC
<i>Ln D10</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	WPC	<i>Ln D5</i>	<i>Ln. lactis</i>	CS
<i>Ln D11</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	QC	<i>Ln LS</i>	<i>Ln. lactis</i>	LP
<i>Ln L79-1</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	CC	<i>Ln N6</i>	<i>Ln. lactis</i>	LP
<i>Ln LcR-1</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	CC	<i>Ln D1</i>	<i>Ln. lactis</i>	LP
			<i>Ln MB1</i>	<i>Ln. citreum</i>	QC

* QC: queso cremoso; WPC: concentrado de proteínas de suero; LP: leche pasteurizada; QSD: queso semi-duro; CC: cepa comercial; QPS: queso Petit Suisse; CS: crema de suero.

Tratamientos de estrés

El análisis multivariado por componentes principales (ACP) describió el aporte de los distintos factores de estrés (choques) en dos componentes, siendo la varianza total acumulada del 83,7% (CP1 53,4% y CP2 30,3%). La representación en dos dimensiones para las puntuaciones de CP1 y CP2 (Fig. 2) permitió la visualización de tres grupos (I, II y III) en relación a la resistencia frente a los factores de estrés evaluados. En el grupo I se ubicaron todas las cepas de *Ln. lactis* y *Ln. mesenteroides* *Ln MB7* como excepción; en el grupo II, mayoritariamente *Ln. mesenteroides* y *Ln. pseudomesenteroides* *Ln D16* como excepción; y en el grupo III, *Ln. pseudomesenteroides* y *Ln. citreum* *Ln MB1*. La resistencia disminuye desde el grupo I al III. Los resultados del desarrollo en condiciones sub-letales se muestran en la Fig. 3. Las cepas *Ln N6* y *Ln N19* revelaron el mejor comportamiento general, mientras que *Ln N12*, *Ln D2*, *Ln D11* y *Ln MB7* (en ese orden) también mostraron una buena *performance* de desarrollo.

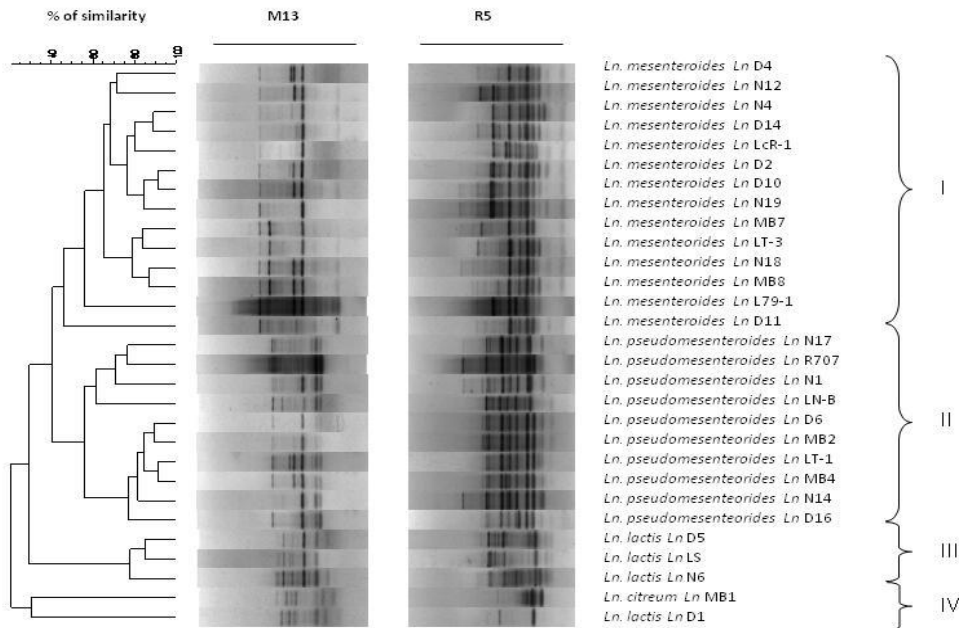


Figura 1. Dendrograma obtenido para las cepas de *Leuconostoc* estudiadas, aplicando RAPD-PCR, usando los *primers* M13 y R5.

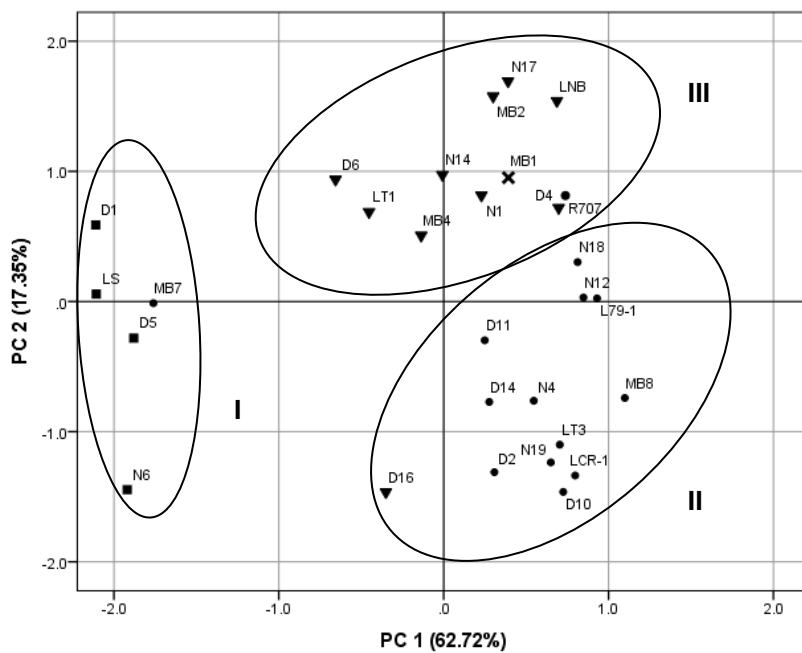


Figura 2. Gráfico de puntuaciones del análisis de componentes principales obtenido para la resistencia a distintos factores de estrés aplicados sobre células de *Leuconostoc* en fase estacionaria temprana de desarrollo. Referencias: *Leuconostoc lactis* (■), *Leuconostoc mesenteroides* (●), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (▼) y *Leuconostoc citreum* (×).

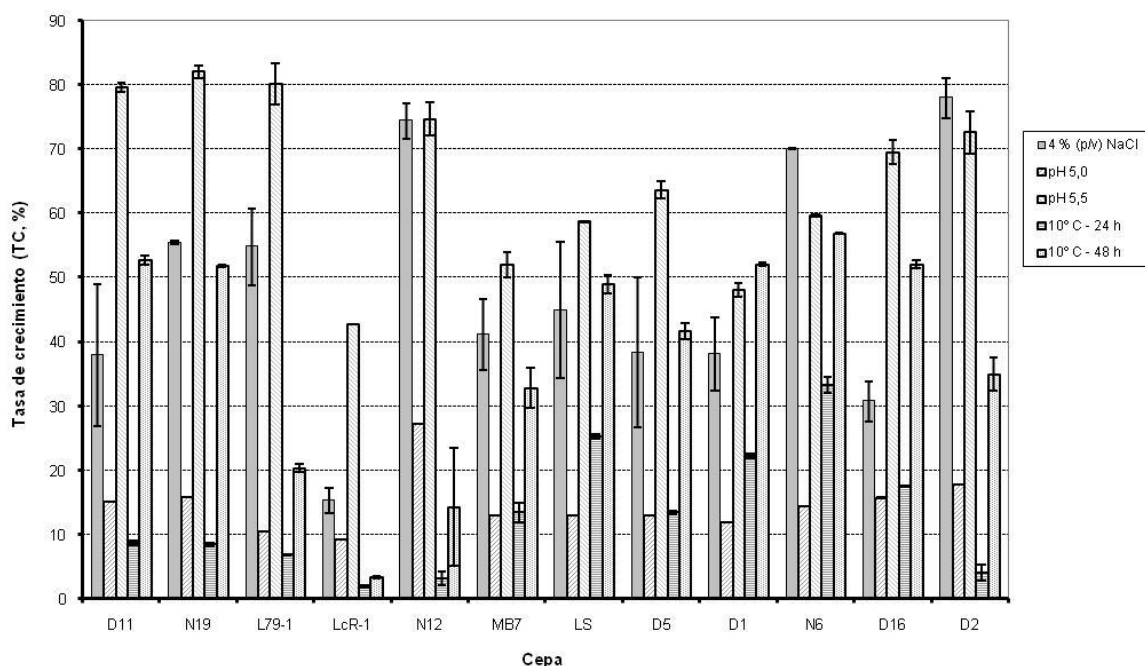


Figura 3. Desarrollo de las cepas de *Leuconostoc* en diferentes condiciones de estrés sub-lethal, en relación al desarrollo en condiciones control (caldo MRS, 30°C-24h).

CONCLUSIONES

El estudio mostró una gran variabilidad de respuesta de las cepas frente a los factores de estrés ensayados. Se encontró una clara relación entre el nivel de resistencia y la especie estudiada, siendo *Ln. lactis* la más resistente y *Ln. pseudomesenteroides* y *Ln. citreum* las más sensibles. No se observó relación entre valores de resistencia y características físicas y / o de obtención del producto del cual fueron aisladas. Del grupo más resistente a los choques, las dos cepas que mejor desarrollaron en condiciones de estrés sub-lethal fueron *Ln* N6 y *Ln* MB7, por lo cual podrían tenerse en consideración para el diseño de *starters* de uso industrial.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Björkroth J., Holzapfel W.**, 2006. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M. (Ed.), The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria (3rd ed.). Springer-Verlag, New York, pp. 267-319.
- Hemme D., Foucaud-Scheunemann C.**, 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. International Dairy Journal, 14, 467-494.
- Pogačić T., Maillard M.-B., Leclerc A., Hervé C., Chuat V., Valence F., Thierry A.**, 2016. *Lactobacillus* and *Leuconostoc* volatiles in cheese conditions. Applied Microbial and Cell Physiology, 100, 2335-2346.
- De Angelis M., Gobbetti M.**, 2011. Stress responses of lactobacilli. In: Tsakalidou, E., Papadimitriou, K. (Eds.), Stress Responses of Lactic Acid Bacteria, Food Microbiology and Food Safety. Springer Science Business Media, LLC, pp. 219-249 (Chapter 11).
- Serrazanetti D., Guerzoni M.E., Corsetti A., Vogel R.**, 2009. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. Food Microbiology, 26, 700-711.
- Ferrando V., Quiberoni A., Reinheimer J., Suárez V.**, 2015. Resistance of functional *Lactobacillus plantarum* strains against food stress conditions. Food Microbiology, 48, 63-71.