

## OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE UN EXOPOLISACÁRIDO (EPS) DE LA CEPA AUTÓCTONA *Lactobacillus fermentum* LF2

Correa Olivar Gabriela<sup>A</sup>, Batistela Virginia<sup>A</sup>

<sup>A</sup>Instituto de Lactología Industrial INLAIN-UNL-CONICET

Área: Ingeniería  
Sub-Área: Alimentación  
Grupo: X

**Palabras clave:** DISEÑO EXPERIMENTAL, EXOPOLISACÁRIDO, OPTIMIZACIÓN.

### INTRODUCCIÓN

Algunas bacterias ácido lácticas (BAL) son capaces de producir y excretar ciertos polímeros de carbohidratos denominados exopolisacáridos (EPS), slime o filantes, modificando la textura y consistencia del medio. Estos compuestos han sido utilizados en la industria láctea mediante su producción *in situ* usando cepas EPS+, ya que presentan propiedades emulsionantes, espesantes y gelificantes, además de reducir la sinéresis y mejorar las propiedades reológicas en yogur (Daboury col., 2006; Zisu y Shah, 2005). Asimismo, suelen ejercer efectos beneficiosos para la salud del consumidor, mediante una serie de propiedades funcionales.

Desde el punto de vista tecnológico, los EPS cumplen una importante función como espesantes naturales, sin embargo, el bajo rendimiento de los hetero-EPS que producen las BAL (80-600 mg/L; Cerning, 1995; Rúas-Madiedo y col., 2002) limita su uso para fines comerciales. Además, el rendimiento en la producción, la estructura y las propiedades reológicas, como la viscosidad, varían con factores externos como la composición del medio de cultivo y las condiciones de desarrollo (Pettry col., 2000; Vaningelgem y col.t, 2004; Wang y Lu, 2005).

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, los objetivos de este trabajo fueron: optimizar la producción del EPS de la cepa autóctona *Lactobacillus fermentum* Lf2, aplicando estrategias de diseño experimental y técnicas de optimización simultánea en medio SDM y bajo condiciones de desarrollo controladas, variando las concentraciones de las fuentes nitrogenadas del mismo; y evaluar el efecto del tiempo de fermentación sobre la producción de EPS, con el fin de minimizar el tiempo, y por ende los costos, del proceso.

### METODOLOGÍA

#### **Cepa, medio y condiciones de cultivo**

La cepa *L. fermentum* Lf2 se desarrolló rutinariamente en MRS (Biokar) en aerobiosis, a 37°C y se conservó en MRS+ 15%v/v de glicerol, a -80°C.

#### **Desarrollo para la producción de EPS**

Se utilizó un medio semidefinido SDM (Kimmel y Roberts, 1998), con glucosa 2% (m/v) como fuente de carbono y analizando como factores las tres fuentes nitrogenadas: Bacto Casitona, base nitrogenada de levadura y citrato de amonio, variando su contenido en función del diseño de mezclas D-Optimal (Figura 1 y Tabla 1). La máxima cantidad de fuente nitrogenada en total es igual a 1,7% (m/v), valor que se obtiene al sumar los porcentajes de las tres fuentes en el medio SDM sin modificar. El medio de

Proyectos: 1. "Potencial funcional (in vitro e in vivo) y tecnológico de exopolisacáridos (EPS) producidos por bacterias lácticas y bifidobacterias", Proyecto PIP 2013 (CONICET), 112 201201 00124CO, Res. 4316/13.

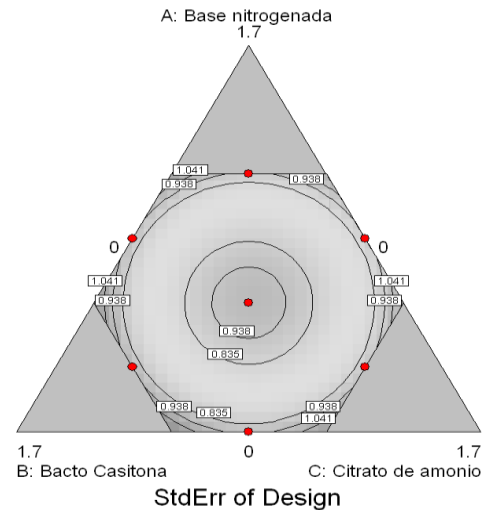
Director del proyecto: Dra. Ana Binetti

Director del becario/tesista: Dra. Ana Binetti

Co-autores: Vera Candioti, Luciana; Ale, Elisa; Binetti, Ana.

cultivo se inoculó con un cultivo overnight (18 h) de la cepa (0,1 % v/v), empleando un biofermentador de 2 L Sartorius Biostat A plus a 30°C por 72 h, con una agitación de 200 rpm y burbujeo de CO<sub>2</sub> a 0,2 L/min., manteniendo el pH constante en un valor de 6,0, mediante el agregado automático de NaOH 8 M.

**Figura 1.** Distribución de puntos experimentales (puntos rojos) obtenidos mediante el Diseño D-Optimal para las 3 fuentes nitrogenadas del medio SDM: Base nitrogenada de levadura, Bacto Casitona y citrato de amonio.



**Tabla 1.** Composición de los medios de cultivo según el diseño D-Optimal. Fuente de Carbono: Glucosa 2% (m/v)

Experimento	%Base Nitrogenada de levadura	%Bacto Casitona	%Citrato de Amonio
1	1,133	0,283	0,283
2	0,850	0,850	0,000
3	0,850	0,000	0,850
4	0,283	1,133	0,283
5	0,283	0,283	1,133
6	0,000	0,850	0,850
7	0,567	0,567	0,567

### Extracción y purificación de EPS

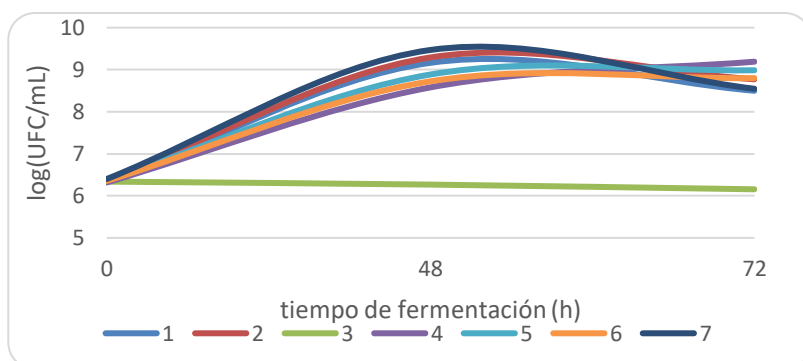
Se tomaron muestras de 200 mL a las 48 y 72 h de desarrollo, se centrifugaron (19000 g, 30 min, 4°C) y, a partir del sobrenadante, se extrajo el EPS crudo por precipitación con dos volúmenes de etanol absoluto frío (Cicarelli), durante 48 h a 4 °C y se separó el EPS por centrifugación (4000 g, 30 min, 4 °C). El pellet se resuspendió en agua bidestilada estéril y se dializó (membranas de 12–14 kDa MWCO, Sigma-Aldrich) en agua destilada durante 3 días a 4 °C, se liofilizó (Chris Alpha 1-4 LD Plus), se pesó y se expresó como gramos de extracto de EPS/L, restando el precipitado del medio control (sin inocular).

### Tratamiento estadístico de datos

Los diseños experimentales y su análisis estadístico se realizaron con la versión gratuita de prueba del programa Design Expert 8.0.5.

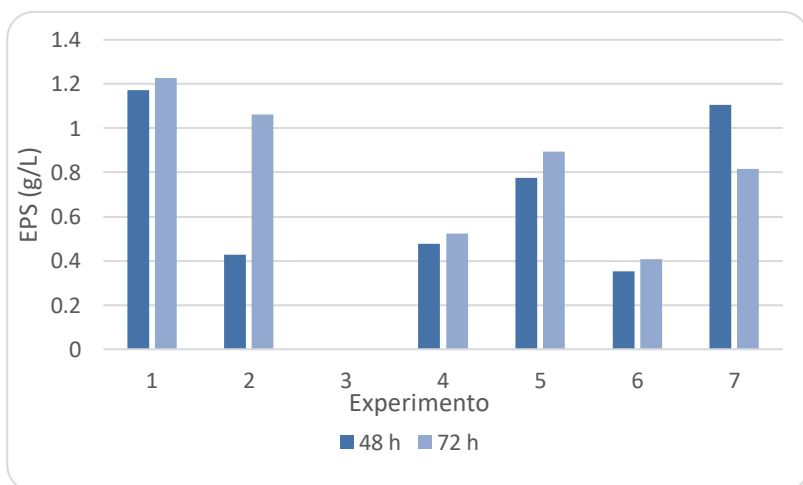
## RESULTADOS

Los resultados obtenidos para los recuentos durante el desarrollo de la cepa se pueden observar en la Figura 2. Para los puntos 1, 2 y 7 se llegó al máximo de los recuentos a las 48 h ( $> 1.10^9$  UFC/mL), descendiendo la viabilidad celular un orden logarítmico luego de 72 h. Para el punto 3 se puede observar que no fue posible en observar el desarrollo de la cepa. En cambio, para los puntos 4, 5 y 6 se obtuvieron los recuentos más altos a las 72 h, siendo el crecimiento más notable en el punto 4 ( $1,5.10^9$  UFC/mL) al final de la incubación, en comparación al obtenido a 48 h.



**Figura 2.** Recuentos celulares (log UFC/mL) en función del tiempo de fermentación para cada medio de cultivo (1 al 7).

En la Figura 3 se pueden observar los rendimientos obtenidos para cada medio de cultivo analizado, a las 48 y 72 h de incubación.



**Figura 3.** Rendimiento de EPS (g/L) a las 48 y 72 h para cada medio de cultivo analizado.

Se observa que la mayor producción del EPS (g/L) se obtiene con la combinación de las tres fuentes nitrogenadas, propuesta por el punto 1 del diseño D-Optimal, mostrando un valor aproximado a 1,2 g/L. Otro punto que también mostró un buen ( $> 1$ g/L) rendimiento fue aquel con las condiciones experimentales centrales del punto 7. De todas maneras, no logró superar los valores obtenidos con la composición del experimento 1.

Los datos experimentales correspondientes a la producción de EPS a las 48 (R1) y 72 h (R2) fueron ajustados con modelos polinomiales. Los coeficientes de los factores se obtuvieron por regresión múltiple con eliminación backward y fueron validados por un análisis de varianza (ANOVA). La producción de EPS a las 48 h se ajustó con un modelo lineal con interacciones dobles y triples (ec. 1) y la producción de EPS a las 72 h se ajustó con un modelo lineal (ec. 2). Estos modelos son los que mejor explican el comportamiento de los datos, obteniendo un valor de probabilidad del modelo de

0.0072 para R1 y 0.0043 para R2, y un R2 ajustado de 0,999 para la R1 y de 0,9650 para la R2.

$$\text{ecuación 1 } \mathbf{Producción\ de\ EPS\ 48\ h = 1,19 \times BN - 0,25 \times BC + 0,64 \times Cit - 0,27 \times BN \times BC - 2,14 \times BN \times Cit + 5,37 \times BN \times BC \times Cit}$$

$$\text{ecuación 2 } \mathbf{Producción\ de\ EPS\ 72\ h = 0,94 \times BN - 0,04 \times BC + 0,51 \times Cit}$$

siendo BN la base nitrogenada, BC la Bacto Casitona y Cit el citrato.

En las ecuaciones de ajuste, los coeficientes de los factores indican la significancia que tiene la variable sobre la respuesta.

## CONCLUSIONES

Analizando los resultados en su conjunto, los factores que tienen mayor peso sobre la producción serían, según orden de importancia, la base nitrogenada, el citrato de amonio y la Bacto Casitona. La interacción triple de estos factores también juega un papel importante para la producción de EPS a las 48 h.

Atendiendo a la necesidad de minimizar los tiempos de desarrollo, para de este modo, economizar en el uso de recursos –como ser CO<sub>2</sub>– y nutrientes del medio de cultivo, se comparan los valores de EPS obtenidos a las 48 y 72h, donde se aprecia un aumento de rendimiento final poco significativo. Por todo lo expuesto, proponemos realizar fermentaciones de 48 h para continuar el estudio de optimización, analizando por ejemplo otras variables como pH, porcentaje de fuente de C e influencia de otra fuente carbonada económica como la sacarosa.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ale E., Perezlindo, M. J., Burns, P., Tabacman, E., Reinheimer, J. y Binetti, A.** (2016). Exopolysaccharide from *Lactobacillus fermentum* Lf2. Application as food additive in yogurt: functional characterization. *J. Dairy Res.*, 83, 487-492.
- Ale, E., Perezlindo, M. J., Pavón, Y., Costa, S., Sabbag, N., Peralta, G., Bergamini, C., Reinheimer, J. y Binetti, A.** (2016). Exopolysaccharide from *Lactobacillus fermentum* Lf2. Application as food additive in yogurt: technological, rheological and sensorial characterization. *Food Res. Int.*, 90, 487-492.
- Cerning, J.** (1995). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*, 75, 463-472.
- Dabour, N., Kheadr, E., Benhamou, N., Fliss, I. y LaPointe, G.** (2006). Improvement of texture and structure of reduced-fat Cheddar cheese by exopolysaccharide-producing lactococci. *J. Dairy Sci.*, 89(1), 95–110.
- Kimmel, S. A. y Roberts, R. F.** (1998). Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *International J. Food Microbiol.*, 40(1-2), 87-92.
- Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M. J., Cerning, J. y Desmazeaud, M.** (2000). Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3427-3431.
- Rúas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. y Zoon, P.** (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 12, 163-171.
- Vaningelgem, F., Zamfir, M., Adriany, T. y De Vuyst, L.** (2004). Fermentation conditions affecting the bacterial growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST 111 in milk-based medium. *J. Appl. Microbiol.*, 97, 1257-1273.
- Wang, Y. X. y Lu, Z. X.** (2005). Optimization of processing parameters for the mycelial growth and extracellular polysaccharide production by *Boletus* spp. ACCC 50328, *Process Biochem.* 40, 1043-1051.
- Zisu, B. y Shah, N. P.** (2005). Textural and functional changes in low-fat Mozzarella cheeses in relation to proteolysis and microstructure as influenced by the use of fat replacers, pre-acidification and EPS starter. *Int. Dairy J.*, 15(6-9), 957-972.