

## PREPARACIÓN DE UN FERMENTO LÁCTICO CONCENTRADO CONGELADO PARA MEJORAR PAN SIN GLUTEN

**Paulón, Florencia**

*Instituto de Lactología Industrial (INLAIN)*

*Directora: Capra, M. Luján;*

*Codirectora: Quiberoni, Andrea*

Área: Ingeniería

Palabras claves: Fermento láctico, Conservación, Pan sin gluten.

### INTRODUCCIÓN

Los productos sin gluten no están ampliamente disponibles, son costosos, menos palatables y nutricionalmente más pobres que el pan de trigo tradicional (Arendt y col., 2011). El reemplazo de gluten en panificación es un desafío ya que el mismo otorga las propiedades viscoelásticas a la masa y su ausencia genera panes con baja calidad tecnológica.

Ciertas bacterias ácido lácticas heterofermentantes influyen positivamente en varios aspectos de calidad de los panificados. La cepa *Weissella cibaria* 20 (W20), utilizada en un trabajo previo como fermento para elaborar pan libre de gluten, demostró aptitud para mejorar sensorial y estructuralmente el producto obtenido (Peverengo, 2018). Su uso podría resultar una alternativa natural a las metodologías actualmente disponibles para el mejoramiento de panes.

Un paso crítico para el uso masivo de microorganismos es su producción a gran escala. En laboratorio el medio de cultivo más ampliamente utilizado para crecimiento de bacterias lácticas es el formulado por *de Man, Rogosa and Sharpe* (MRS). Si bien el rendimiento en biomasa de este medio en su versión comercial es muy bueno, su uso a escala piloto o industrial no resulta viable debido a su alto costo. Para sortear este obstáculo se diseñó un medio económico y libre de TACC con el fin de propagar la biomasa para el posterior escalado a la producción industrial del fermento. Entre los diferentes medios ensayados se eligió al medio a base de permeado de suero suplementado con una fuente de carbono y demás aditivos debido a que permitió la producción de  $10^9$  UFC/ml de células de W20 en tan solo 4 h. A su vez esta utilización del lactosuero es una opción tecnológica innovadora por la posibilidad de dar un nuevo uso a las grandes cantidades producidas en las industrias lácteas.

Además de las propiedades fisiológicas relevantes del cultivo (producción de compuestos de aroma y sabor, producción de metabolitos que favorezcan la conservación, producción de exopolisacáridos, etc.) requeridas para mejorar la calidad del pan, para la producción económica de cultivos iniciadores es necesario que este logre buen crecimiento en un caldo de fermentación de bajo costo y transparente, así como altas tasas de supervivencia durante los procesos de conservación (congelación o secado) (Brandt, 2014).

### OBJETIVOS

- Optimizar y simplificar condiciones operativas de un fermentador de laboratorio para maximizar producción de biomasa de W20, con una adecuada capacidad de desarrollo y a bajo costo.
- Evaluar la estabilidad y vida útil durante el almacenamiento congelado del cultivo iniciador W20, y su funcionalidad tecnológica en elaboración de pan sin TACC.

Título del proyecto: Pan mejorado para celíacos por adición de bacterias lácticas. Optimización de la preparación del cultivo *starter*", IO-2017- 00096

Instrumento: Investigación Orientada

Año convocatoria: 2017

Organismo financiador: ASaCTel

Director/a: Capra, María Luján

## METODOLOGÍA

### Producción del cultivo iniciador (W20cc)

Se realizaron fermentaciones en un reactor tanque agitado de laboratorio con control de temperatura y pH (Sartorius Biostat A plus de 2 L), en un medio a base de permeado de suero de quesería y demás aditivos (PSQ) inoculado (1 % v/v) con W20. Se probaron dos fuentes de carbono para suplementar el medio de cultivo: glucosa, calidad analítica, agregada post-tratamiento térmico del medio de cultivo (PSQG) y sacarosa, como azúcar común Tipo A, agregada previo al tratamiento térmico (PSQS)-en presencia de este hidrato W20 es capaz de producir exopolisacáridos libres o capsulares (EPC)-. Se ensayaron siete fermentaciones, variando las condiciones operativas (Tabla 1).

**Tabla.** Condiciones ensayadas en las distintas fermentaciones para la producción de biomasa en biorreactor. En la F1 se utilizó el medio PSQG, en las demás fermentaciones (F2-F7) se usó el medio PSQS. Todas las fermentaciones se ensayaron a una temperatura de 30 °C.

Fermentaciones	pH	Agitación (rpm)	Burbujeo de CO <sub>2</sub>	Tiempo (h)
F1	Libre	150	-	8
F2	Libre	150	-	8
F3	5,6*	150	-	9
F4	5,6*	150 (0-5 h) / 250 (5-9 h)	-	9
F5	5,6*	150 (0-5 h) / 400 (5-9 h)	-	9
F6*	5,6*	150 (0-5 h) / 250 (5-9 h)	0-5 h	9
F7	5,6*	150 (0-5 h) / 250 (5-7 h)	-	7

\*El pH se controló con NaOH 8 M.

\*Se agregó antiespumante (2 ml) a las 1,5 h.

Durante las fermentaciones se determinó la viabilidad por recuentos microbiológicos en MRS agarizado (24 h, 30 °C, en microaerofilia), se siguió el desarrollo de W20 de manera indirecta a través de medidas de densidad óptica a 560 nm (DO<sub>560</sub>) en espectrofotómetro (Metrolab M1700, Mercosur), evolución del pH y del potencial de O<sub>2</sub>. La biomasa producida se centrifugó (8000 rpm, 10

min, 10 °C) y se determinó la masa del *pellet* en base húmeda. Luego se lavó dos veces con *buffer* fosfato (50 mM, pH 7) y finalmente se concentró 10 veces de su volumen original.

### Conservación de W20cc

El cultivo producido en el punto anterior se conservó de manera congelada durante 6 meses. Se ensayaron 2 temperaturas de congelamiento -20 °C y -80 °C y 4 medios de suspensión: leche descremada estéril (LDE) utilizada como control según Burns y col. (2008), PSQS, *buffer* fosfato 50 mM, pH 7 (BF) y sobrenadante de fermentación con ajuste a pH 6,5 (SN).

Se estudió la viabilidad celular (VC) y la funcionalidad tecnológica (FT) de W20cc. La VC se determinó previo al congelamiento (t00), al día siguiente del congelamiento (t0) y cada mes (t1-t6) para todos los congelados (ambas temperaturas y todos los medios de suspensión) por recuentos microbiológicos en agar MRS (24 h, 30 °C, en microaerofilia).

La FT se determinó al t00, t3 y t6 solo para el medio de suspensión y la temperatura en que se obtuvo mayor VC. Se analizó por desempeño de W20cc en elaboraciones de pan sin TACC, observando capacidad para reproducir mejoras ya demostradas. Se elaboraron tres panes: pan control (PC) preparado según el proveedor de la premezcla (solo fermentada con levadura) y dos panes experimentales (PE1 y PE2) fermentados primero con W20 (20 h, 30 °C) y luego, con levadura según se optimizó en un trabajo previo (Peverengo, 2018). PE1 fue elaborado con W20 propagada en MRS y PE2, con W20 propagada en fermentador y congelada en la opción de conservación con mayor VC (W20cc).

## RESULTADOS

### Producción del cultivo iniciador

El crecimiento de W20 en las diferentes fermentaciones mostró el mismo comportamiento (Figura 1), aumentó siempre 1 orden logarítmico a las 2 h y 2 órdenes logarítmicos luego de 4 h; lo que muestra versatilidad tecnológica de la cepa interesante para la producción industrial de biomasa. En F1 (con PSQG) el máximo desarrollo celular ( $1,6 \cdot 10^9$  UFC/ml) se produjo a las 4 h, mientras que en las fermentaciones en PSQS valores entre  $2,6$  y  $5,5 \cdot 10^9$  UFC/ml se obtuvieron entre las 7 y 8 h. Se eligió el agregado de azúcar común para preparar el medio con sacarosa (PSQS) por su eficacia, bajo costo y facilidad en los aspectos operativos. Al controlar el pH (F3-F7) los recuentos fueron mayores  $4,5 \cdot 10^9$ -  $5,5 \cdot 10^9$  UFC/ml en comparación con F2 y F1. En F4, donde se aumentó la agitación a 250 rpm se obtuvo el mayor recuento celular ( $5,5 \cdot 10^9$  UFC/ml); en F5 (aumento a 400 rpm) y F6 (burbujeo de  $\text{CO}_2$ ) el recuento celular también fue alto ( $5,3 \cdot 10^9$  y  $5,1 \cdot 10^9$  UFC/ml, respectivamente) (Figura 1).

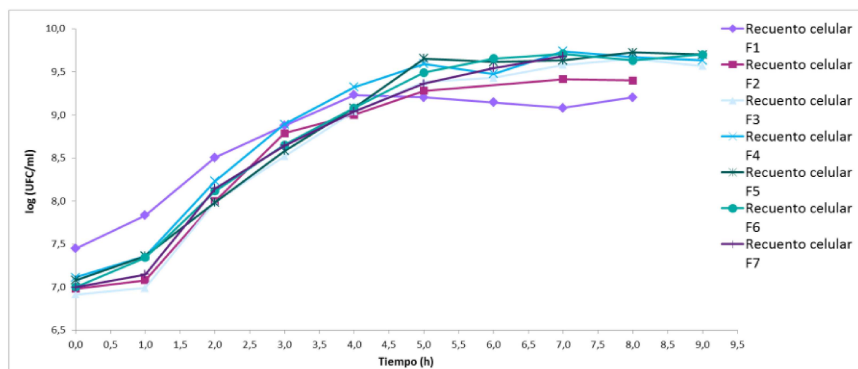


Figura 1. Curvas de crecimiento celular de W20 en las distintas fermentaciones (F1-F7) en biorreactor.

La cosecha de biomasa en PSQS, F1 (13,9 g) fue mayor que en PSQG (8 g), debido a la presencia de los EPC (Tabla 2). A pH controlado (5,6) la biomasa producida en F3 (45,8 g) aumentó ya que de ese modo se contrarresta la acidez que produce la célula,

favoreciendo su desarrollo. El incremento de agitación (150 a 250 rpm) a la 5ta hora, causó mayor producción de células (21,5 g) por sobre la producción de EPC (17,4 g). El aumento de la velocidad de agitación (de 250 a 400 rpm) y el burbujeo de  $\text{CO}_2$  (0 a 5 h), no mejoraron la producción (Tabla 2), pero complejizaron y encarecieron la operación. La fermentación con W20 en PSQS a pH controlado y con aumento de agitación (de 150 a 250 rpm en la 5ta hora) logró capacidad de desarrollo apropiada, siendo esta condición utilizada en la producción de células de W20 para la prueba de conservación.

Tabla 2. Producción de biomasa (masa celular + EPC) en las distintas fermentaciones.

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
<b>Biomasa (g)</b>	8	13,9	45,8	38,9	26,2	36,5	47
<b>Masa celular (g)</b>	8	12,5	18,5	21,5	25	25	24
<b>EPC (g)</b>	-	1,4	27,3	17,4	1,2	11,5	23

### Conservación: Determinación de la viabilidad celular y la funcionalidad tecnológica

La VC a  $-80$  °C se mantuvo para todos los medios durante los 6 meses (Figura 2). A  $-20$  °C cayó levemente para LDE y SN, pero en PSQS disminuyó 2,3 órdenes log al sexto mes, mientras que en BF conservó la VC original durante los 6 meses (Figura 2). Por ser BF el medio más económico y  $-20$  °C, temperatura disponible en la industria, se seleccionó ese congelado para elaborar los PE2 en el estudio de la FT.

La FT luego de 3 y 6 meses a  $-20^{\circ}\text{C}$  en BF se mantuvo en comparación con el PE1 (fermentado con W20 propagada en MRS) mostrando para ambos (PE1 y PE2) mayor volumen específico, alveolos más pequeños y con distribución regular (Figura 3), y mejoras organolépticas - aroma y sabor suavizados, eliminación del *flavor* a almidones residuales y leve acidez que asemeja a “pan de campo”- respecto del pan control.

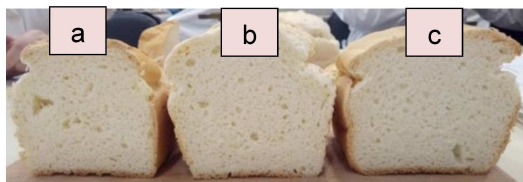


Figura 3. a) Pan control, b) PE1, c) PE2 luego de 24 h de elaboración.

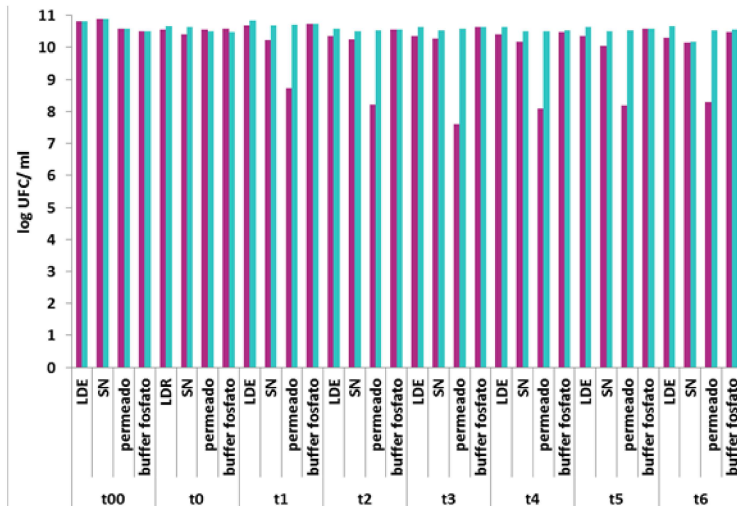


Figura 2. Viabilidad celular de W20 durante 6 meses a  $-20^{\circ}\text{C}$  (■) y  $-80^{\circ}\text{C}$  (■) en los distintos medios de suspensión: LDE, SN, PSQS y BF.

## CONCLUSIONES

- Para la producción de biomasa de W20 se eligió la F7 debido a que permite adecuada capacidad de desarrollo elevada concentración de biomasa (masa celular y EPC) y condiciones simples de operación del fermentador, que facilitan el escalado.
- W20 conservó su viabilidad aún en BF, sugiriendo que los EPC producidos por la bacteria actuarían como crioprotectores.
- Se logró producir un fermento de W20 que, conservado en BF a  $-20^{\circ}\text{C}$ , es eficiente como cultivo iniciador al menos por 6 meses para la elaboración de pan sin TACC.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arendt, E. K.; Moroni, A.; Zannini, E.** 2011. Medical nutrition therapy: use of sourdough lactic acid bacteria as a cell factory for delivering functional biomolecules and food ingredients in gluten free bread. *Microbial Cell Factories*, 10 (Suppl 1):S15, 1-9.
- Brandt, M. J.** 2014. Starter cultures for cereal based foods. *Food Microbiology* 37, 41-43.
- Burns, P.; Vinderola, G.; Molinari, F.; Reinheimer, J.** 2008. Suitability of whey and buttermilk for the growth and frozen storage of probiotic lactobacilli. *International Journal of Dairy Technology* 61, 156-164.
- Peverengo, M. R.** 2018. Caracterización tecnológica de lactobacilos heterofermentantes. Potencialidad de aplicación en masas panarias para prolongar la vida útil de pan para celíacos. Tesina de Licenciatura en Biotecnología (FBCB-UNL). INLAIN (UNL-CONICET) e ITA (FIQ-UNL), Santa Fe, Argentina.