

Impacto de la liofilización y la temperatura de almacenamiento en la viabilidad y actividad de *Lactiplantibacillus plantarum* L29

PRADA, Sofía D.

¹Instituto de Lactología Industrial (INLAIN-UNL-CONICET), Santa Fe, Argentina
Director: Peralta, Guillermo H.
Codirectora: Bergamini, Carina V.

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Fermentos, Liofilizados, Estabilidad.

INTRODUCCION

Los fermentos secundarios, también llamados de afinado o de maduración, se emplean ampliamente en quesería para estandarizar la calidad del producto y para acelerar, diversificar o mejorar el flavour. La producción industrial de estos fermentos implica la aplicación de una serie de etapas en la que se destaca el proceso de conservación, ya que el mismo puede afectar tanto la viabilidad como su actividad metabólica. En la actualidad, los fermentos industriales se conservan mediante liofilización, congelación o secado spray. A pesar del alto costo de inversión que requiere el proceso de liofilización, es el más utilizado por las grandes plantas, ya que tiene numerosas ventajas en comparación con las otras tecnologías de conservación (Peighambardoust et al., 2011).

En el INLAIN (UNL/CONICET, Santa Fe) se han aislado e identificado numerosas cepas de origen NSLAB (non-starter lactic acid bacteria) de quesos argentinos de buena calidad. Muchas de ellas, en particular *Lactocaseibacillus paracasei* 90 (L90), *Lactocaseibacillus rhamnosus* 73 (L73) y *Lactiplantibacillus plantarum* 29 (L29), han mostrado muy buena performance como fermento secundario en quesería, destacándose la capacidad de formar aroma, acelerar la proteólisis, y controlar la microbiota (Giménez et al., 2023, Peralta et al., 2023). La aplicación de procesos de conservación y estudios de estabilidad (viabilidad y actividad metabólica) se han realizado hasta el momento solamente en las cepas L90 y L73, por lo que en este trabajo se focalizó en el estudio de estos parámetros en la cepa L29.

OBJETIVOS

Evaluar el impacto de la liofilización y de la temperatura de almacenamiento en la culturabilidad, viabilidad y actividad metabólica de L29.

Título del proyecto: PEICID-2022-037. Homogeneización de alta presión y tratamiento con liozima: aplicación sobre fermentos para obtener un pool enzimático con impacto en el flavor, seguridad y funcionalidad de quesos reducidos en sal.

Año convocatoria: 2022

Organismo financiador: Agencia Santafesina de Ciencia Tecnología e Innovación

Director: Peralta, Guillermo Hugo



METODOLOGÍA

Preparación de las células, liofilización y almacenamiento

La cepa L29 fue inoculada al 2% v/v en un medio optimizado, formulado a partir de permeado de suero de queso, e incubada a 37°C por 24h. Las células obtenidas fueron centrifugadas (10000g, 10min, 4°C), lavadas dos veces con buffer fosfato de potasio (50mM, pH=7) y resuspendidas en una solución conteniendo maltodextrina 10% p/v y sacarosa 3% p/v, obteniéndose una suspensión celular de aprox. 10 log UFC/mL. La suspensión obtenida fue fraccionada en viales de vidrio (2 mL/vial) y congelada a -80°C. Los viales congelados fueron sometidos a un ciclo de liofilización de 24 h utilizando el equipo Christ Alpha 1-4 LD plus (Alemania). Los viales fueron almacenados durante 8 meses a -20°C, 5°C, y 20°C. Se realizaron recuentos microbiológicos: antes y después de liofilizar, y durante el almacenamiento. Al finalizar el almacenamiento se realizaron además estudios de culturabilidad, viabilidad y actividad metabólica en leche fermentada, tal como se describe a continuación.

Determinaciones de culturabilidad, viabilidad, y actividad en leche fermentada

La capacidad de crecimiento se determinó en medio de cultivo MRS agarizado luego de una incubación por 48 h a 37°C en condiciones de microaerofilia. Para el caso de los liofilizados, se les reincorporó el agua perdida en el proceso de liofilización adicionando agua estéril a los viales, y luego se realizó el recuento en la suspensión obtenida.

El estado fisiológico de las células se determinó mediante citometría de flujo utilizando el kit comercial BD™ Cell Viability (BD Biosciences) que contiene naranja de tiazol (TO) e yoduro de propidio (PI). Las muestras fueron analizadas en un citómetro Guava® EasyCyte™ (Guava Technology). La adquisición y el análisis de los datos se realizó con el software Guava CytoSoft™ 3.6.1.

La actividad metabólica fue evaluada en leches fermentadas. Las células fueron inoculadas al 2% v/v en leche estéril, e incubadas a 37°C por 24 h. Al finalizar la incubación, se realizó la determinación de recuentos microbiológicos, pH, lactosa y ácido láctico según Beret et al. (2021).

Análisis estadístico

El experimento fue realizado por triplicado. Los datos obtenidos fueron analizados por ANOVA de una vía utilizando el software InfoStat. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante la prueba de Tukey. El nivel de significancia estadística para ambos casos fue de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Culturabilidad y viabilidad

El proceso de liofilización no afectó significativamente el nivel de culturabilidad (aprox. 10 log UFC/mL antes y después del proceso). Por otro lado, en la Fig.1a se puede ver claramente que la temperatura de almacenamiento impactó significativamente la culturabilidad de la cepa. A los 4 meses de almacenamiento, hubo una ligera disminución en las cepas conservadas a 5°C y -20°C,



mientras que las almacenadas a 20°C mostraron una reducción significativa ($p < 0,05$), alcanzando un valor promedio de 9,3 log UFC/mL. A los 8 meses de almacenamiento, las cepas conservadas a 5°C y -20°C mantuvieron niveles altos (aprox. 9,8 log UFC/mL). Por el contrario, el almacenamiento a 20°C continuó impactando negativamente en la culturabilidad ($p < 0,05$), llegando a niveles de 8,7 log UFC/mL.

En la Fig.1b se observan los distintos gráficos dot plot del análisis de viabilidad por citometría de flujo de las células almacenadas a las tres temperaturas (-20°C, 5°C, y 20°C). También se incluye el dot plot de las células controles (vivas, injuriadas y muertas). Es evidente que, independientemente de la temperatura de almacenamiento, la mayoría de las células están ubicadas en la región de células viables (R2). De hecho, el análisis estadístico de estos resultados no arrojó diferencias significativas entre las distintas temperaturas de almacenamiento. Estos resultados indican que, si bien la capacidad de crecimiento en medio de cultivo fue afectada, no necesariamente se modifica su viabilidad.

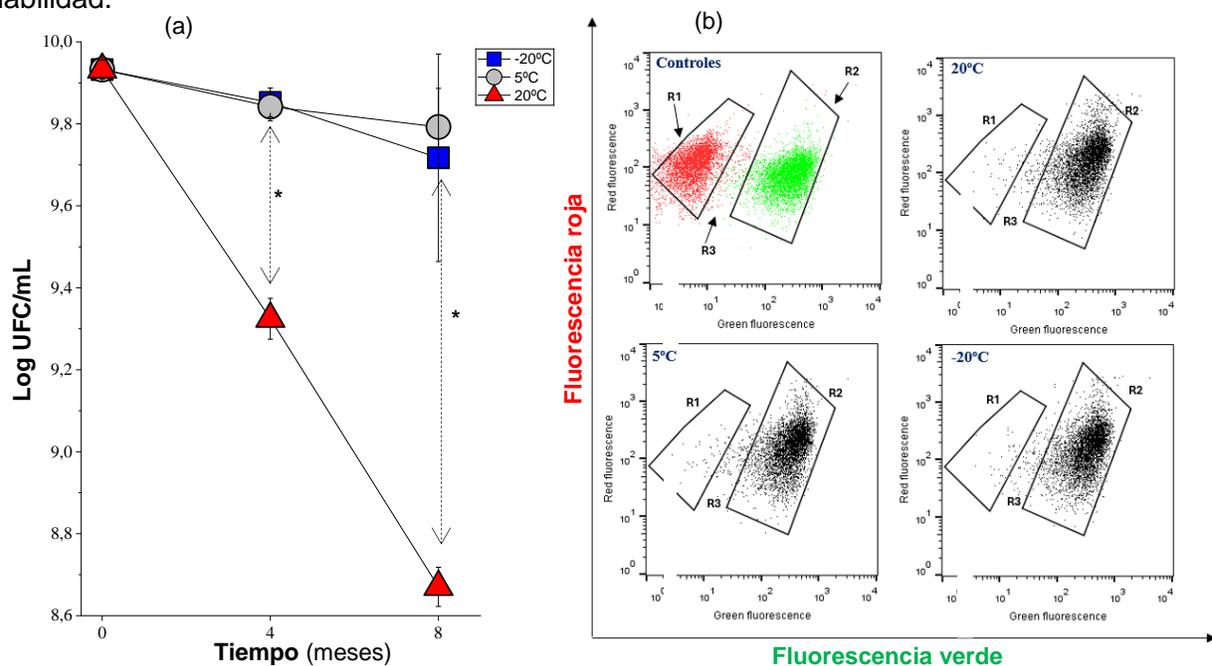


Figura 1: a. Recuentos microbiológicos del polvo liofilizado de la cepa L29 durante el almacenamiento a distintas temperaturas. El asterisco (*) indica que hubo diferencias significativas ($p < 0,05$). b. Gráficos dot plot de una de las réplicas del análisis de citometría de flujo de las células liofilizadas de L29 almacenadas a 20°C, 5°C y -20°C. R1: región de células muertas. R2: región de células viables. R3: región de células injuriadas.

Actividad en leche fermentada

En las Fig. 2a y 2b se observan los resultados de los parámetros estudiados en las leches fermentadas con las células almacenadas durante 4 y 8 meses, respectivamente. Para ambos tiempos de almacenamiento, es claro ver que el nivel de crecimiento y la concentración de lactosa no fueron afectados ($p > 0,05$) por la temperatura de almacenamiento. Teniendo en cuenta los niveles de lactosa en la leche control incubada sin la cepa (aprox. 5100 mg/100mL), se evidenció un bajo nivel de consumo de lactosa en las LF. Esta baja actividad de acidificación destaca el

potencial de L29 como fermento secundario en quesería, ya que cepas muy acidificantes podrían tener un impacto negativo en la calidad del queso. Por otro lado, se observaron algunas ligeras diferencias ($p < 0,05$) en el nivel de pH tanto a 4 como a 8 meses de almacenamiento, y en la concentración de ácido láctico de las leches fermentadas con las células almacenadas durante 8 meses; sin embargo, el nivel de láctico producido fue muy bajo en todas las LF (aprox. $< 175 \text{mg}/100 \text{mL}$).

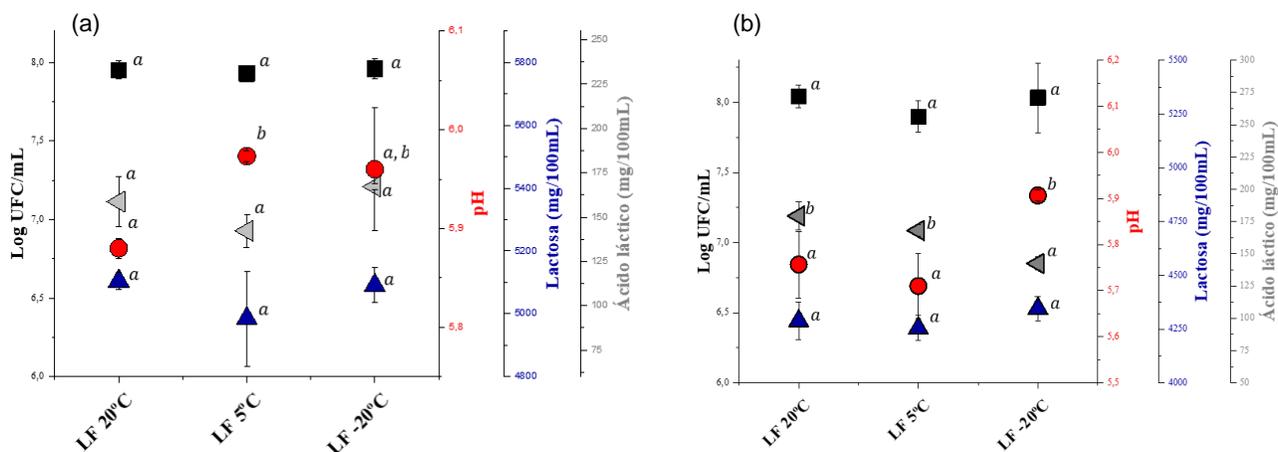


Figura 2: Recuentos microbiológicos (■), pH (●), lactosa (▲) y ácido láctico (◄) en leches fermentadas (LF) preparadas con las células liofilizadas y almacenadas durante 4 meses (a) y 8 meses (b) a 20°C, 5°C y -20°C. Diferentes letras para un mismo parámetro indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES

En líneas generales se observó que la capacidad de crecimiento, viabilidad y actividad de L29 no fueron modificadas por el proceso de liofilización y por los 8 meses de almacenamiento a -20 y 5 °C. Por el contrario, se evidenció un efecto negativo del almacenamiento a 20°C sobre la viabilidad del liofilizado.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Beret MV, Peralta GH, Vera-Candioli L, Wolf IV, Hynes ER, Bergamini CV. (2021). Culture media based on effluent derived from soy protein concentrate production for *Lactocaseibacillus paracasei* 90 biomass production: statistical optimisation, mineral characterization, and metabolic activities. *Antonie Van Leeuwenhoek* 114, 2047–2063.

Giménez P, Peralta GH, Batistela ME, Cuffia F, Ale EC, Wolf IV, Perotti MC, Hynes ER, Bergamini CV. 2023. Impact of the use of skim milk powder and adjunct cultures on the levels of organic acid and carbohydrates, volatile compounds, and sensory properties of Cremoso cheese. *International Dairy Journal*, 140, 105594.

Peighambardoust, S. H., Golshan Tafti, A., & Hesari, J. (2011). Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 22(5), 215-224.

Peralta, G. H., Beret, V., Bürgi, M., Ale, E. C., Martínez, L. J., Albarracín, Wolf V. H. & Bergamini, C. V. (2023). Impact of media culture, freeze-drying and storage conditions on preservation of *Lactocaseibacillus paracasei* 90: Viability and metabolic potential as a secondary culture in semi-hard cheese. *International Dairy Journal*, 147, 105763.