



USO DE DERIVADOS DE LACTOSUERO EN PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS: ¿UNA NUEVA PROBLEMÁTICA PARA LA INDUSTRIA? Machado, Nicolás

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET)

Directora: Suárez, Viviana Beatriz

Codirectora: Briggiler Marcó, Mariángeles

Área: Ingeniería

Palabras claves: industria láctea, derivados de lactosuero, bacteriofagos

INTRODUCCIÓN

Título del proyecto: "Diseño de estrategias innovadoras para inactivación de bacteriófagos en ambientes de la industria láctea" Código: IO-2017-00003
Instrumento: Investigación Orientada 2017
Año convocatoria: 2017
Organismo financiador: Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación (ASaCTel)
Director/a: Briggiler Marcó, Mariángeles

El desarrollo de nuevas tecnologías, fundamentalmente la concentración por membranas ha permitido, en los últimos años, reutilizar el suero de quesería, tradicionalmente considerado un desecho industrial altamente contaminante del medio ambiente, convirtiéndolo en un ingrediente valioso para las industrias alimentarias. El agregado de derivados de suero de quesería en la elaboración de nuevos productos lácteos es actualmente utilizado por muchas industrias, con el objetivo de aumentar el rendimiento del proceso, elevar el valor nutricional y/o mejorar la textura del producto. Sin embargo, investigadores europeos han demostrado que estos derivados de suero pueden ser portadores de fagos líticos viables y que, al ser adicionados en nuevas elaboraciones fermentativas, podrían infectar a las bacterias ácido-lácticas (BAL) de los cultivos *starter* usados, causando retraso o inhibición total de su actividad fermentativa, generando productos con características organolépticas no adecuadas e incluso poco seguros desde el punto de vista microbiológico (Atamer y col., 2013). En los sueros de quesería la concentración de fagos presentes puede llegar a ser muy elevada ($> 10^9$ UFP/ml) (Atamer y col., 2013). Este suero se somete a una serie de tratamientos (pasteurización, concentración por membranas, secado, etc.) con el objetivo de obtener diversos derivados, algunos de los cuales serán utilizados como ingredientes en la elaboración de productos lácteos fermentados (leches fermentadas y quesos). Sin embargo, es bien sabido que muchos fagos son capaces de soportar las temperaturas de pasteurización y, además, son retenidos junto a las proteínas de suero durante los procesos de concentración por membranas (Wagner y col., 2017). En consecuencia, si el suero líquido "original" fuera portador de partículas fágicas, su procesamiento podría resultar en la concentración de los mismos en los subproductos derivados, incrementando el riesgo de infecciones fágicas sobre los cultivos *starter* usados a escala industrial. De esta forma, un ingrediente que tiene por finalidad mejorar las características de un determinado producto lácteo fermentado, puede convertirse en una peligrosa fuente de fagos que conduzca al fracaso de toda la producción, con el consiguiente impacto económico negativo.

En este sentido, **el sector industrial nacional no posee aún una noción real sobre los potenciales riesgos de contaminación fágica que se generaría mediante la**

incorporación de derivados de lactosuero en sus líneas de producción. Este trabajo es el primero en abordar el tema, por lo que los datos derivados del mismo tendrán una trascendental importancia para el sector.

OBJETIVOS

- Realizar un relevamiento de la presencia de fagos líticos en muestras de derivados de suero de quesería, sobre cepas comerciales de *Streptococcus thermophilus* utilizadas por la industria en nuestro país.
- Estudiar la diversidad fágica existente en muestras de diversos orígenes.
- Determinar la capacidad infectiva de los fagos aislados, así como también la sensibilidad de los fermentos comerciales.

METODOLOGÍA

Cepas y preparación de las muestras

Tabla 1: Muestras usadas en el presente estudio

Muestra	Origen ^a	Tipo de muestra ^b	Fecha procesamiento
1-11	A	WPC 35	Agosto 2017
12	B	WPC 50	Octubre 2017
13	A	WPC 80	Octubre 2018
14	C	WPC 35	Noviembre 2018
15	C	WPC 35	Marzo 2019

a: Plantas de procesamiento de lactosuero (A) y lácteas (B y C), proveedoras de las muestras de WPC.

b: Porcentaje de proteína en las muestras de WPC (35, 50 y 80%)

Para el estudio se utilizaron 37 cepas de *St. thermophilus* aisladas de distintos fermentos comerciales utilizados en el país, disponibles en el cepario del INLAIN. Las muestras de WPC (*Whey Protein Concentrate*) fueron provistas por dos industrias lácteas y una de procesamiento de suero de quesería (Tabla 1). Las mismas se reconstituyeron al 10% (p/v) en agua destilada estéril y se centrifugaron a 13000 rpm

durante 15 min. Los sobrenadantes se filtraron utilizando membranas con diámetro de poro de 0,45 µm para eliminar los residuos bacterianos.

Aislamiento, purificación y conservación de (bacterio)fagos

La búsqueda de bacteriofagos se realizó mediante el Test de Turbidez, utilizando cepas comerciales de *Streptococcus thermophilus* pertenecientes a la colección del INLAIN. En este sentido, las potenciales cepas hospedadoras se inocularon (2% v/v) en tubos con caldo M17 (Biokar, Beauvais, Francia), adicionados de CaCl₂ (10 mM). Posteriormente, se agregaron 500 µl de los filtrados de las muestras, incubándose a 43°C y monitoreando visualmente la turbidez en comparación con la del tubo control (adicionado solamente con la cepa). Se realizaron 3 repiques sucesivos de estos cultivos a fin de aumentar la concentración de las partículas fágicas potencialmente presentes en las muestras. En los casos en los que se observó lisis celular, la presencia de partículas fágicas se verificó por la visualización de placas de lisis utilizando el método de la doble capa agarizada (Pujato y col., 2014). Los fagos se purificaron y propagaron a partir de las placas de lisis obtenidas, se almacenaron como *stock* de trabajo a 4°C y se congelaron a -20°C y -80°C, pasando a formar parte de la Fagoteca del INLAIN. La concentración de las partículas fágicas (UFP/ml) en las muestras de WPC se determinó mediante el método de la doble capa agarizada.

Diversidad genética

La diferenciación genética de los fagos obtenidos se realizó mediante corte con enzimas de restricción. La obtención de ADN de los fagos se realizó según Pujato y col. (2014) y los mismos fueron digeridos con las enzimas EcoRV y EcoRI (Lavelle y col., 2018), los fragmentos obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1%). Para la construcción del/los dendrograma/s a partir de los perfiles de restricción obtenidos se utilizó el *software* BioNumerics™ (versión 6.0, Applied Maths BVBA, Saint-Martens-Laten, Bélgica), con el Método UPGMA (agrupamiento) y factor de Jackard (similitud).

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Un total de 87 fagos fueron aislados cuando se ensayaron 15 muestras de WPC de distintas concentraciones proteicas con 37 cepas comerciales de *St. thermophilus*. La Figura 1 muestra la distribución porcentual de las muestras en relación con la cantidad de aislamientos realizados por muestra, es decir cuando no fue posible aislar fagos (0) o cuando se realizaron entre 1 a 3, 4 a 8 y 9 a 18 aislamientos por muestra. El 80 % de las muestras estudiadas (12 sobre 15 totales) mostraron presencia de fagos líticos, frente a 1 o más cepas (Figura 1). En particular, 3 muestras evidenciaron un alto grado de contaminación ya que se aislaron fagos infectivos para una cantidad elevada de cepas (15, 17 y 18 cepas). En cuanto a la concentración de los fagos en las muestras, la misma osciló entre < 10 UFP/g y 10^5 UFP/g, demostrando que en muchos casos (58 % de las 12 muestras positivas) la presencia fágica rondó en valores considerados riesgosos ($> 10^4$ UFP/g) (Atamer y col., 2013).

Figura 1: Distribución porcentual de muestras en cuanto a la cantidad de aislamientos realizados.

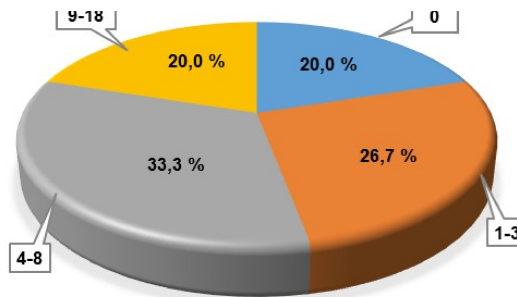
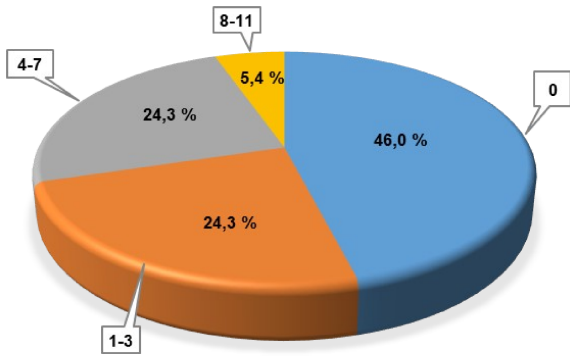


Figura 2: Distribución porcentual de cepas según su sensibilidad frente a fagos presentes en las muestras analizadas.

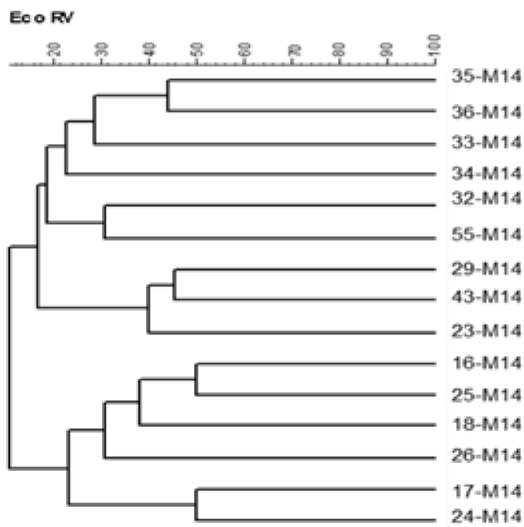
En cuanto a la sensibilidad de las cepas utilizadas, el 54% (20 cepas) resultaron sensibles al menos a un fago aislado (Figura 2). En la Figura 2 se muestra la distribución porcentual de cepas según su sensibilidad a los fagos presentes en las muestras ensayadas, es decir si no lisaron con ninguna muestra (0) o bien si lo hicieron frente a 1-3, 4-7 u 8-11 muestras. En particular, un 5,4% de ellas evidenció elevada sensibilidad fágica (lisis frente a 8-11 muestras) por lo que no serían buenas candidatas para ser utilizadas como fermentos cuando se agregan estos derivados.



Asimismo, es de destacar que cuando se ensayaron cepas pertenecientes a un mismo fermento, mientras una resultó ser muy sensible la otra no lisó en ningún caso (datos no mostrados). Es así que un proceso fermentativo que usara este fermento posiblemente pudiera ser conducido aún en presencia de estos fagos, por medio de las cepas que mostraron resistencia fágica, aunque probablemente no al mismo nivel que si ambas desarrollaran su actividad de manera normal.

Asimismo, es de destacar que cuando se ensayaron cepas pertenecientes a un mismo fermento, mientras una resultó ser muy sensible la otra no lisó en ningún caso (datos no mostrados). Es así que un proceso fermentativo que usara este fermento posiblemente pudiera ser conducido aún en presencia de estos fagos, por medio de las cepas que mostraron resistencia fágica, aunque probablemente no al mismo nivel que si ambas desarrollaran su actividad de manera normal.

Figura 3: Dendrograma de los perfiles de restricción de los aislamientos obtenidos a partir de una muestra.



capaces de infectar a un amplio espectro de cepas, aunque las mismas sean muy diferentes entre sí.

Por otra parte, la diferenciación realizada a través de restricción con endonucleasas demostró una altísima diversidad genética entre los fagos aislados. A modo de ejemplo, se muestra en la Figura 3 el dendrograma obtenido a partir del análisis de los perfiles de restricción (con la enzima EcoRV) de los fagos aislados a partir de una muestra. Esta situación demuestra la alta peligrosidad del uso de algunas muestras de WPC, a partir de las cuales fue posible, no solamente aislar un elevado número de fagos, sino también demostrar una amplia diversidad entre ellos. El uso de estas muestras en procesos fermentativos incorporaría fagos

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la peligrosa presencia de fagos infectivos en un elevado número de muestras de WPC, en algunos casos en alta concentración, además de una gran diversidad entre ellos. La industria láctea deberá tener en cuenta las posibles consecuencias relacionadas a infecciones fágicas sobre las cepas del fermento utilizado, cuando plantee el uso de esos derivados de lactosuero en algún proceso fermentativo. En la actualidad se está llevando a cabo una segunda etapa de trabajo que incluye la caracterización fenotípica (morfología, espectro de huéspedes, resistencia térmica y química, parámetros infectivos) de los fagos aislados. Asimismo, se pretende caracterizarlos desde el punto de vista

genotípico (secuenciación), a fin de diseñar estrategias para disminuir la frecuencia de sus ataques.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Atamer, Z., Samtlebe, M., Neve, H., Heller, K.J., Hinrichs, J. 2013. Review: elimination of bacteriophages in whey and whey products. *Frontiers in Microbiology*, 4, 191-199.

Pujato, S.A., Guglielmotti, D.M., Ackermann H.W., Patrignani F., Lanciotti R., Reinheimer J.A., Quiberoni A. 2014. *Leuconostoc* bacteriophages from blue cheese manufacture: long-term survival, resistance to thermal treatments, high pressure homogenization and chemical biocides of industrial application. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 81-88.

Wagner, N., Samtlebe, M., Franz, C. M.A.P., Neve, H., Heller, K. J., Hinrichs, J., Atamer, Z. 2017. Dairy bacteriophages isolated from whey powder: thermal inactivation and kinetic characterization. *International Dairy Journal*, 68, 95-104.

Lavelle, K., Martinez, I., Neve, H., Lugli, G.A., Franz, C.M.A.P., Ventura, M., dal Bello, F., van Sinderen, D., Mahony, J. 2018. Biodiversity of *Streptococcus thermophilus* Phages in Global Dairy Fermentations. *Viruses*, 10, 577-596.