



Encuentro
de JÓVENES
INVESTIGADORES

CONSERVACIÓN DE UN FERMENTO LÁCTICO CAPAZ DE MEJORAR PRODUCTOS PANIFICADOS SIN GLUTEN.

Gómez, Alicia Ernestina

*Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET)
Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Litoral
Directora: Capra, María Luján
Codirectora: Guglielmotti, Daniela Marta*

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Fermento Láctico, *Weissella*, Tecnologías de Conservación.

INTRODUCCIÓN

Entre los bacilos lácticos heterofermentantes, *Weissella* conforma un género que hoy en día está siendo intensamente estudiado por su gran potencial como cultivo *starter* para diversos alimentos fermentados. En trabajos previos, observamos que la cepa *Weissella confusa* 20 (W20) mejora textura y características organolépticas de pan de molde y pan dulce sin gluten por fermentación prolongada de premezclas sin TACC y que produce abundante cantidad de exopolisacáridos cuando crece en presencia de sacarosa (Paulón, 2019; Prieto, 2020). El cultivo láctico propaga eficientemente a escalas laboratorio y piloto, en reactor tanque agitado con control de temperatura y pH, en un medio de cultivo sustentable y de bajo costo preparado en base a un subproducto de la industria láctea adicionado de ciertos componentes de calidad industrial y comercial siendo, por lo tanto, apto para aplicación a gran escala.

OBJETIVOS

- Evaluar diversas tecnologías y medios de suspensión para la conservación del fermento láctico de *Weissella confusa* 20 (W20).
- Determinar estabilidad y vida útil del fermento W20 durante su almacenamiento a diferentes temperaturas.

METODOLOGÍA

Reactivación de W20

La cepa *Weissella confusa* 20 (W20), perteneciente al Ceparío del INLAIN e identificada en un trabajo previo por secuenciación de un fragmento del gen que codifica para la región 16S del ADNr, se reactivó a partir de un cultivo puro congelado (-20 °C) inoculándola (4% v/v) en

Título del proyecto: FERMENTO LÁCTICO PARA MEJORAR PANES SIN GLUTEN. OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES Y PROCESOS PARA PRODUCIR BIOMASA
Instrumento: PICT
Año de la convocatoria: 2018
Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)
Directora: Capra, María Luján; Co-directora: Daniela Guglielmotti



caldo MRS (de Man, Rogosa and Sharpe, Biokar, Beauvais, Francia) a 30 °C durante 24 h y, subcultivándola (cultivo o.n. al 2% v/v) en caldo PSQS (permeado de suero de quesería adicionado de sacarosa, como azúcar común tipo A).

Producción de biomasa de W20 en fermentador

Se utilizó un reactor tanque agitado a escala laboratorio con termostatación y control de pH (Sartorius Biostat A plus de 2 L), operado según condiciones optimizadas en un trabajo anterior (Paulón, 2019). El medio PSQS se inoculó (1% v/v) a partir del cultivo reactivado de W20 y se fermentó a 30 °C por 7 h con control de pH a 5,6 y agitación (150 rpm hasta las 5 h, 250 rpm hasta las 7 h). El crecimiento de W20 se monitoreó muestreando a distintos tiempos (0, 2, 4, 5 y 7 h), mediante recuentos microbiológicos en MRS agarizado (30 °C, 24 h), microscopía óptica de contraste de fase (microscopio trinocular Jenamed 2, Carl Zeiss-Jena) y por verificación de la producción de CO₂ a lo largo de la fermentación.

Al final de la fermentación se centrifugó (8.000 rpm, 10 min, 10 °C) separándose las fracciones *pellet* (biomasa) y sobrenadante, cuyo pH se ajustó a 7 (SN₇) previo a su conservación congelado a -20 °C. Sobre una alícuota del *pellet* se determinaron los sólidos totales correspondientes a la biomasa, según Lavari (2016).

Pruebas de conservación

Sendas fermentaciones se realizaron con el fin de obtener biomasa para los diferentes ensayos. El *pellet* cosechado se concentró a 1/10 del volumen original (cultivo concentrado, Cc) suspendiéndolo en diferentes medios propuestos según la tecnología de conservación. Se evaluó la viabilidad celular (VC) en el fermento de W20, mediante recuentos microbiológicos: previo y posterior a la aplicación de cada método y a intervalos mensuales durante el almacenamiento; en los diferentes medios propuestos y a cada temperatura de conservación.

Crioconservación

Los medios propuestos fueron: a) solución tampón fosfato (BF, 50 mM, pH 7), b) SN₇. Los Cc se homogeneizaron, se alicuotaron en microtubos estériles y se congelaron a -20 y -80 °C. Previo a determinar la VC, las muestras se descongelaron en baño de agua termostatación (30 °C, 30 min), según lo propuesto por Gaggiano y col. (2007).

Conservación por secado *spray*

Los medios propuestos fueron: a) SN₇ + 30% (p/v) de maltodextrina (SN₇-MD), b) SN₇ + 30% (p/v) de permeado de suero de quesería (SN₇-PSQ30).

Ambos Cc fueron deshidratados mediante un *Spray Dryer* Yamato (ADL311S, Japón), temperatura de entrada 170 °C, temperatura de salida 82 °C; los polvos se envasaron al vacío y almacenaron a 4 y -20 °C. Adicionalmente, se determinó el contenido de humedad en los mismos (Lavari, 2016). Previo a determinar la VC y para su reconstitución, los polvos se hidrataron en agua destilada estéril (suspensión al 20% p/v) por 15 min a 30 °C.

Conservación por liofilización

Los medios propuestos fueron: a) SN₇, b) SN₇ + 20% (p/v) de PSQ (SN₇-PSQ20). Los Cc homogeneizados y alicuotados en viales de vidrio estériles (2 ml), se deshidrataron por sublimación en un liofilizador de laboratorio (Christ LCG Alpha 1-4 LD Plus, Alemania). Los viales fueron almacenados a 4 y -20 °C para su conservación. Previo a determinar la VC, los liofilizados fueron reconstituidos añadiendo un volumen de agua destilada estéril



equivalente al eliminado en la operación y se dejaron hidratar por 15 min a temperatura ambiente.

RESULTADOS

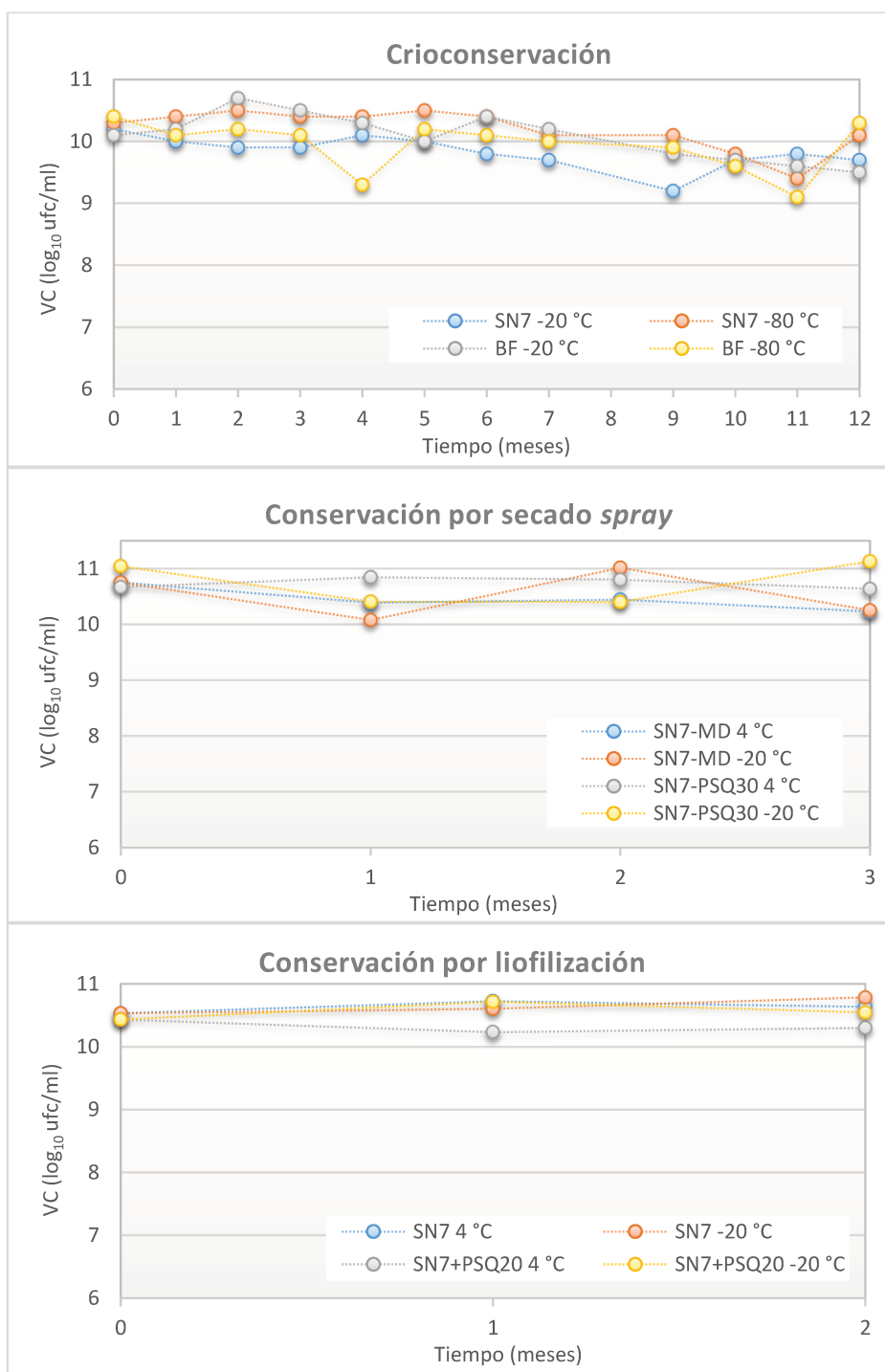


Figura 1. Curvas de viabilidad celular (VC) de W20 en el fermento conservado mediante cada tecnología aplicada en diversos medios de suspensión, durante el almacenamiento a diferentes temperaturas.

De las tres tecnologías evaluadas, la crioconservación produjo las mayores reducciones de la VC (entre 0,5 y 0,8 unidades logarítmicas) a ambas temperaturas y para ambos medios,

luego de la aplicación de la operación. Sin embargo, los recuentos se mantuvieron y resultó adecuada para el almacenamiento. Los Cc congelados promediaron recuentos microbiológicos de 10 órdenes log ufc/ml durante el almacenamiento y mantuvieron valores de VC superiores a 9,1 órdenes logarítmicos, aún transcurridos 12 meses. La VC en los polvos (4-6% humedad) disminuyó 0,1 (SN₇-MD) y 0,5 órdenes logarítmicos (SN₇-PSQ30) luego de la operación de secado *spray* (rendimiento > 96%), manteniéndose en promedio por encima de 10,6 órdenes log ufc/g a lo largo de 3 meses de almacenamiento y con valores de VC > 10,1 órdenes log, para ambas temperaturas y medios de suspensión propuestos. La operación de liofilización no afectó la VC (reducciones post-operación de 0,1-0,2 log ufc/ml), siendo los dos medios protectores igualmente eficientes a tal fin. Los valores de recuentos celulares con promedio de 10,5 órdenes log ufc/g se mantuvieron prácticamente sin cambios (> 10,2 órdenes log ufc/g) durante el almacenamiento (2 meses) (Figura 1).

CONCLUSIONES

La cepa W20 demostró robustez frente a las tres tecnologías de conservación, manteniendo VC elevada durante el almacenamiento para todos los compuestos protectores y a todas las temperaturas estudiadas. Teniendo en cuenta los principios de economía circular y disponibilidad/simpleza de la infraestructura requerida para el almacenamiento, se proponen como mejores opciones al medio SN₇ para la crioconservación y la liofilización, y el medio SN₇-PSQ30 para el secado *spray*, optando por -20 °C como temperatura de almacenamiento. La vida útil del fermento concentrado congelado de W20 fue de al menos 12 meses, alcanzando el estándar de conservación para fermentos lácticos del mercado. Es necesario continuar con las determinaciones de VC en el tiempo para establecer la vida útil del fermento de W20 en polvo.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Gaggiano, M., Di Cagno, R., De Angelis, M., Arnault, P., Tossut, P., Fox, P. F. y Gobbetti, M.** 2007. Defined multi-species semi-liquid ready-to-use sourdough starter. *Food Microbiology* 24, 15-24.
- Lavari, L.** 2016. Secado *spray* aplicado al desarrollo de cultivos probióticos a partir de cepas de lactobacilos autóctonos (Tesis doctoral en Ciencias Biológicas, FBCB-UNL), Instituto Nacional de Tecnología agropecuaria (INTA), Rafaela, Argentina e Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET), Santa Fe, Argentina.
- Paulón F.G.** 2019. Panes mejorados para celíacos. Primeros pasos en el estudio a escala laboratorio de la preparación de un cultivo iniciador de lactobacilos heterofermentantes (Tesina de grado de Lic. en Biotecnología, FBCB-UNL). Instituto de Lactología Industrial (INLAIN-CONICET), Santa Fe, Argentina.
- Prieto P.** 2020. Pan dulce para personas celíacas. Formulación de la premezcla y adición de fermentos lácticos para mejorado del producto (Tesina de grado de Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, FIQ-UNL). Instituto de Lactología Industrial (INLAIN-CONICET), Santa Fe, Argentina.

