

## **Leuconostoc en la industria de alimentos: comportamiento en condiciones de estrés tecnológico.**

**Joaquín Cicotello**

*Instituto de Lactología Industrial (Universidad Nacional del Litoral – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Facultad de Ingeniería Química, Santiago del Estero 2829, S3000AOM Santa Fe, Argentina.*

**Área:** Ingeniería  
**Sub-Área:** Alimentos

### **INTRODUCCIÓN**

*Leuconostoc* es una bacteria láctica heterofermentante que cumple un rol muy importante en la producción de compuestos de aroma (diacetilo, alcoholes y acetoina) en productos lácteos fermentados como crema, manteca y quesos. Su función es fundamental en quesos azules, donde la producción de CO<sub>2</sub> permite la apertura de la pasta y el desarrollo fúngico posterior (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004; Björkroth y Holzapfel, 2006; Pogačić y col., 2016). Las bacterias constituyentes de los cultivos iniciadores (*starters*) están sometidas a distintos factores de estrés durante su preparación y / o durante el proceso de elaboración del producto final. El estudio de la respuesta a estas condiciones desfavorables es indispensable para una correcta selección de cepas al momento de proponer su uso industrial (Serrazanetti y col., 2009; De Angelis y Gobbetti, 2011), lo cual constituyó el objetivo principal de este trabajo.

### **METODOLOGÍA**

#### **Cepas y estudios genéticos**

En este trabajo se utilizaron 29 cepas de *Leuconostoc*, comerciales y aisladas de distintos productos lácteos. Para su uso rutinario se activaron en caldo MRS (30°C - 24 h) y se almacenaron en heladera (7°C). La identificación taxonómica de las cepas se realizó mediante secuenciación de una región variable del gen 16S rARN (500 bp) y el estudio de diversidad genética por RAPD-PCR (*Random Amplification Polymorphic DNA*), usando los oligonucleótidos M13 y R5. El dendrograma se obtuvo usando el método de agrupamiento pareado no ponderado con el algoritmo de media aritmética (*Unweighted Pair-Group Method with Average Algorithm*, UPGMA), utilizando el coeficiente *r* de Pearson como medida de similitud.

#### **Tratamientos de estrés**

Las cepas se sometieron a los siguientes tratamientos de estrés: i) caldo MRS, 15 min – 55°C (choque térmico); ii) buffer sodio-lactato (1 M) pH 4, 30 min – 30°C (choque ácido); iii) buffer glicina - NaOH (0,1 M) pH 9,8, 24 h – 30°C (choque alcalino); iv) solución NaCl (30 % p/v), 24 h – 30°C (choque osmótico) y v) solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,3 % (p / v) 30 min – 30°C (choque oxidativo) (Ferrando y col., 2015). Se obtuvieron los índices de resistencia, definidos como  $IR = \log N_0 / N_f$  ( $N_0$ = recuento inicial de células,  $N_f$ =recuento final de células). Los resultados se procesaron aplicando análisis multivariado de componentes principales (CPA), usando el *software* IBM SPSS Statistics Version 21 (IBM Corp. 2012). Sobre 12 cepas seleccionadas por su mayor resistencia, se estudió el desarrollo en condiciones sub-

Proyecto marco: "*Leuconostoc* en la industria láctea: comportamiento frente a factores de *stress* y estrategias para mejorar su desempeño tecnológico". C.A.I.+D. N° PI 501 201101 00039 LI (2013-2015). Director: Dra. Andrea Quiberoni. Tesina de Licenciatura en Biotecnología. Director del tesinista: Mg. Viviana Suárez, Co-Director: Dra. Daniela Guglielmotti.

letales de estrés según el siguiente protocolo: i) caldo MRS pH 5,0 y 5,5 (24 h - 30°C); ii) caldo MRS pH 8 (24 h - 30°C); iii) caldo MRS – NaCl 4 % (p/v) (24 h - 30°C) y iv) caldo MRS a 10°C, 24 h y 48 h. Se calculó en cada caso la tasa de crecimiento (TC), definida como  $D.O._s / D.O._c \times 100$  (donde  $D.O._s$  = densidad óptica de la cepa bajo condiciones de estrés y  $D.O._c$  = densidad óptica del control, ambas medidas al final de la experiencia).

## RESULTADOS

### Estudios genéticos

Los resultados de la identificación taxonómica se muestran en la Tabla 1. La diversidad intra-especie observada por RAPD-PCR fue amplia. El dendrograma obtenido (Fig. 1) mostró 4 *clusters* (I, II, III y IV), cada uno agrupando las cepas de su misma especie. Dentro de cada *cluster*, se detectaron distintos sub-*clusters*, con similitudes que oscilaron entre 56 % y 66 % para los *clusters* I y II (*Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*, respectivamente). Los *clusters* III y IV incluyeron las cepas de *Leuconostoc lactis* y la única cepa de *Leuconostoc citreum*.

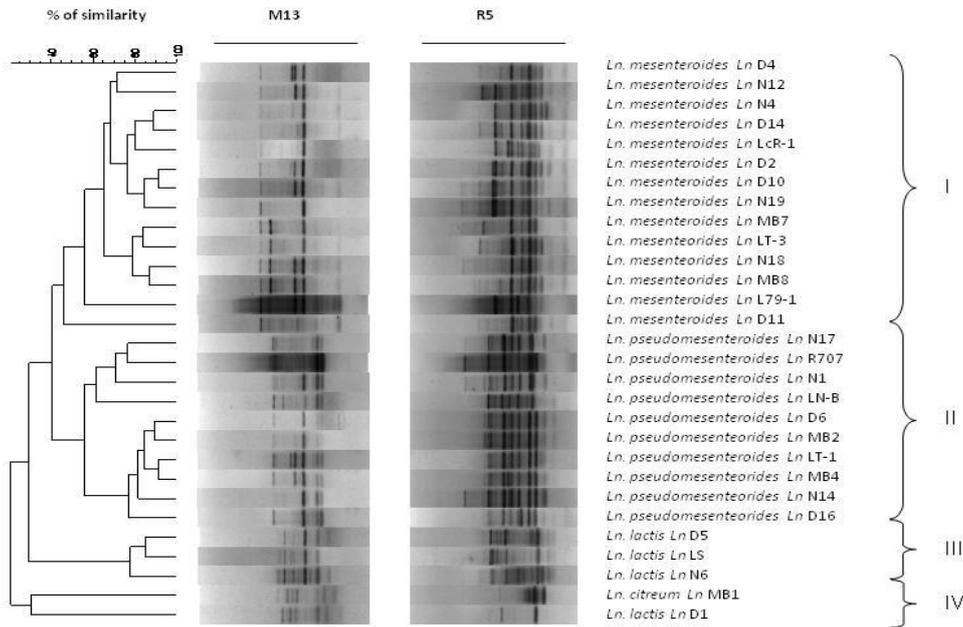
**Tabla 1.** Identificación taxonómica y producto de origen de las cepas de *Leuconostoc* usadas en este estudio.

Cepa	Identificación taxonómica	Origen*	Cepa	Identificación taxonómica	Origen*
<i>Ln MB7</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	QC	<i>Ln R707</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	CC
<i>Ln LT-3</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	QC	<i>Ln N17</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	QC
<i>Ln N18</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	WPC	<i>Ln N1</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	QC
<i>Ln MB8</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	QC	<i>Ln LN-B</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	LP
<i>Ln D4</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	LP	<i>Ln MB2</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	QC
<i>Ln D14</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	WPC	<i>Ln D6</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	LP
<i>Ln N4</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	QC	<i>Ln N14</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	QPS
<i>Ln N19</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	QC	<i>Ln LT-1</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	QC
<i>Ln N12</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	QSD	<i>Ln MB4</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	QC
<i>Ln D2</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	QC	<i>Ln D16</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	QC
<i>Ln D10</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	WPC	<i>Ln D5</i>	<i>Ln. lactis</i>	CS
<i>Ln D11</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	QC	<i>Ln LS</i>	<i>Ln. lactis</i>	LP
<i>Ln L79-1</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	CC	<i>Ln N6</i>	<i>Ln. lactis</i>	LP
<i>Ln LcR-1</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	CC	<i>Ln D1</i>	<i>Ln. lactis</i>	LP
			<i>Ln MB1</i>	<i>Ln. citreum</i>	QC

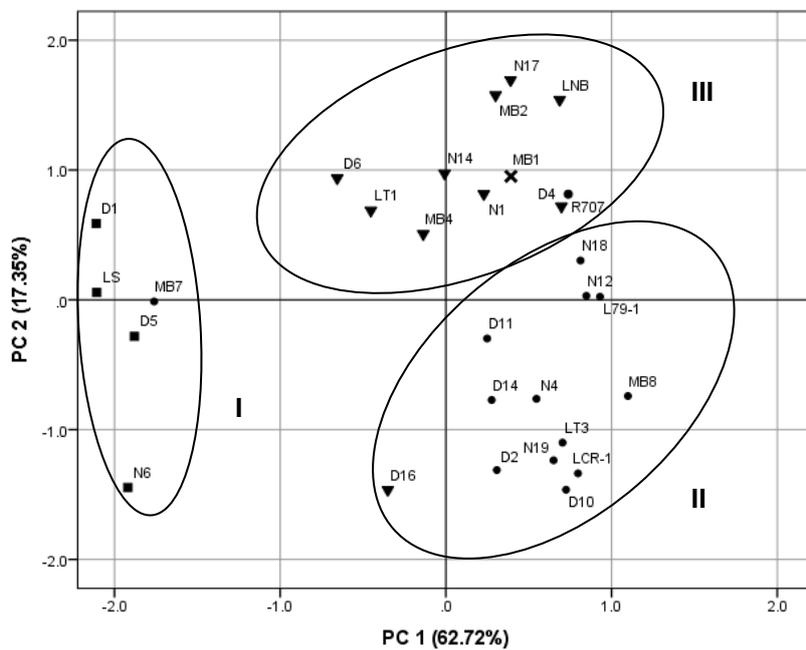
\* QC: queso cremoso; WPC: concentrado de proteínas de suero; LP: leche pasteurizada; QSD: queso semi-duro; CC: cepa comercial; QPS: queso Petit Suisse; CS: crema de suero.

### Tratamientos de estrés

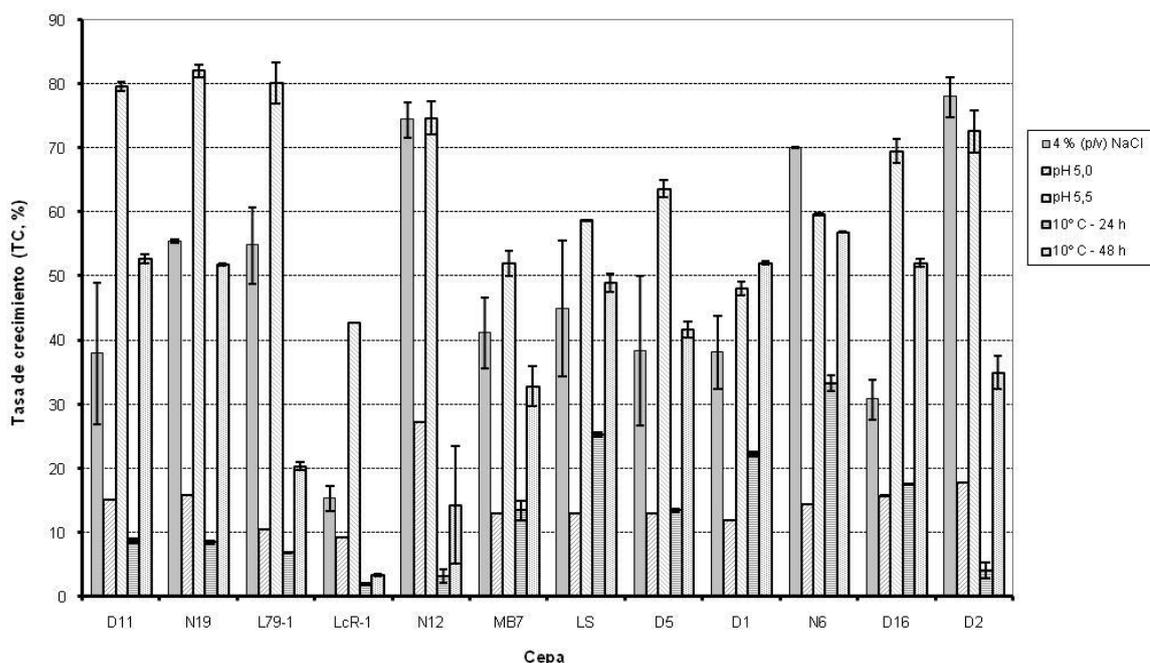
El análisis multivariado por componentes principales (ACP) describió el aporte de los distintos factores de estrés (choques) en dos componentes, siendo la varianza total acumulada del 83,7% (CP1 53,4% y CP2 30,3%). La representación en dos dimensiones para las puntuaciones de CP1 y CP2 (Fig. 2) permitió la visualización de tres grupos (I, II y III) en relación a la resistencia frente a los factores de estrés evaluados. En el grupo I se ubicaron todas las cepas de *Ln. lactis* y *Ln. mesenteroides* *Ln MB7* como excepción; en el grupo II, mayoritariamente *Ln. mesenteroides* y *Ln. pseudomesenteroides* *Ln D16* como excepción; y en el grupo III, *Ln. pseudomesenteroides* y *Ln. citreum* *Ln MB1*. La resistencia disminuye desde el grupo I al III. Los resultados del desarrollo en condiciones sub-letales se muestran en la Fig. 3. Las cepas *Ln N6* y *Ln N19* revelaron el mejor comportamiento general, mientras que *Ln N12*, *Ln D2*, *Ln D11* y *Ln MB7* (en ese orden) también mostraron una buena *performance* de desarrollo.



**Figura 1.** Dendrograma obtenido para las cepas de *Leuconostoc* estudiadas, aplicando RAPD-PCR, usando los *primers* M13 y R5.



**Figura 2.** Gráfico de puntuaciones del análisis de componentes principales obtenido para la resistencia a distintos factores de estrés aplicados sobre células de *Leuconostoc* en fase estacionaria temprana de desarrollo. Referencias: *Leuconostoc lactis* (■), *Leuconostoc mesenteroides* (●), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (▼) y *Leuconostoc citreum* (×).



**Figura 3.** Desarrollo de las cepas de *Leuconostoc* en diferentes condiciones de estrés sub-lethal, en relación al desarrollo en condiciones control (caldo MRS, 30°C-24h).

### CONCLUSIONES

El estudio mostró una gran variabilidad de respuesta de las cepas frente a los factores de estrés ensayados. Se encontró una clara relación entre el nivel de resistencia y la especie estudiada, siendo *Ln. lactis* la más resistente y *Ln. pseudomesenteroides* y *Ln. citreum* las más sensibles. No se observó relación entre valores de resistencia y características físicas y / o de obtención del producto del cual fueron aisladas. Del grupo más resistente a los choques, las dos cepas que mejor desarrollaron en condiciones de estrés sub-lethal fueron *Ln* N6 y *Ln* MB7, por lo cual podrían tenerse en consideración para el diseño de *starters* de uso industrial.

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Björkroth J., Holzapfel W.**, 2006. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M. (Ed.), The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria (3<sup>rd</sup> ed.). Springer-Verlag, New York, pp. 267-319.
- Hemme D., Foucaud-Scheunemann C.**, 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. International Dairy Journal, 14, 467-494.
- Pogačić T., Maillard M.-B., Leclerc A., Hervé C., Chuat V., Valence F., Thierry A.**, 2016. *Lactobacillus* and *Leuconostoc* volatiles in cheese conditions. Applied Microbial and Cell Physiology, 100, 2335-2346.
- De Angelis M., Gobbetti M.**, 2011. Stress responses of lactobacilli. In: Tsakalidou, E., Papadimitriou, K. (Eds.), Stress Responses of Lactic Acid Bacteria, Food Microbiology and Food Safety. Springer Science Business Media, LLC, pp. 219-249 (Chapter 11).
- Serrazanetti D., Guerzoni M.E., Corsetti A., Vogel R.**, 2009. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. Food Microbiology, 26, 700-711.
- Ferrando V., Quiberoni A., Reinheimer J., Suárez V.**, 2015. Resistance of functional *Lactobacillus plantarum* strains against food stress conditions. Food Microbiology, 48, 63-71.