



## INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA ACTIVIDAD METABÓLICA DE *Lactobacillus paracasei* 90

Beret, María V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Lactología Industrial (UNL-CONICET)

<sup>2</sup>Facultad de Ingeniería Química (FIQ-UNL)

Director: Peralta, Guillermo

Codirectora: Bergamini, Carina

Área: Ingeniería

Palabras claves: fermentos, medios de cultivo alternativos, leche fermentada.

### INTRODUCCIÓN

La producción industrial de fermentos lácticos requiere el empleo de medios de cultivo que satisfagan las altas exigencias nutricionales que demandan estos microorganismos. Dadas las complejas composiciones requeridas, estos medios implican un alto costo para la industria. El uso de subproductos y residuos de procesos industriales para la formulación de medios de cultivo microbianos representa, por un lado, la reducción de costos asociados y, por otra parte, una solución amigable con el medio ambiente. En este sentido, varios residuos/subproductos de la industria alimentaria se han utilizado para el desarrollo de microorganismos (Zhang y col., 2015; Lavari y col., 2015; Coghetto y col., 2016). En particular, la producción de aislados y concentrados proteicos a partir de la harina de soja, obtenida luego de la extracción de aceite con solventes, libera corrientes líquidas ácidas, ricas en diversos nutrientes como azúcares, minerales y proteínas de bajo peso molecular. Si bien se ha demostrado que estos efluentes son apropiados para la producción de biomasa de bacterias lácticas (Coghetto y col., 2016; Peralta y col., 2018), hay pocos estudios que evalúan la influencia del crecimiento en estos medios de cultivo alternativos sobre la actividad metabólica de los fermentos.

### OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad enzimática, el perfil de fermentación y la producción de compuestos volátiles de *Lactobacillus paracasei* 90 luego de su crecimiento en medios de cultivo económicos, formulados a partir de subproductos de la industrialización de la soja.

### METODOLOGÍA

Título del proyecto: Producción de biocatalizadores lácticos para mejorar la calidad en los quesos: aprovechamiento de residuos industriales / Tecnologías de membrana y fermentos adjuntos para mejorar la calidad de quesos argentinos  
Instrumento: Investigación Orientada-IO-2017-00036 / PICT 2016-0597  
Año convocatoria: 2017 / 2016  
Organismo financiador: Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación / ANPCyT  
Director/a: Guillermo H. Peralta, Carina V. Bergamini

## Cepa y condiciones de crecimiento

La cepa *Lactobacillus paracasei* 90 (L90) pertenece a la colección de cultivos del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) y ha sido ampliamente caracterizada, demostrando tener buenas características tecnológicas y funcionales luego de su crecimiento en el medio comercial MRS (Milesi y col., 2010; Peralta y col., 2016).

## Medios de cultivos

En base a pruebas preliminares (Peralta y col., 2018) se formuló un medio de cultivo a partir del residuo líquido resultante de la separación de proteínas y materiales insolubles de la harina de soja, procedimiento que es frecuentemente empleado en la industria para obtener aislados y concentrados proteicos. Este residuo contiene gran cantidad de nutrientes que demostraron ser adecuados para el crecimiento de la cepa L90. Para aumentar la producción de biomasa en el medio de cultivo formulado se ensayó el agregado de fuentes de carbono: glucosa y lactosa (permeado de suero de queso), fuente de nitrógeno: extracto de levadura (EL), y minerales:  $MnSO_4$  y  $MgSO_4$ . Utilizando la metodología de superficie de respuesta, se optimizó la producción de biomasa en tres medios de cultivo alternativos, cuya composición se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composición de los medios optimizados formulados a partir de subproductos de la industrialización de la soja.

Medios	Nutrientes adicionados (g/100mL)				
	Glucosa	Lactosa	EL	$MnSO_4$	$MgSO_4$
M1	1,1366	-	0,5329	0,0010	0,0418
M2	-	1,2442	0,5716	0,0028	0,0500
M3	-	-	0,6823	0,0011	0,0500

La cepa L90, proveniente de un cultivo fresco en MRS, se inoculó al 2% en los tres medios de cultivo alternativos y en MRS (control). Las suspensiones se incubaron a 34 °C por 24h.

## Perfil de fermentación y producción de compuestos volátiles en leche

Los cultivos de L90 en M1, M2, M3 y MRS fueron inoculados al 2% en leche entera estéril, la cual se incubó 24h a 37 °C, obteniéndose las leches fermentadas LfM1, LfM2, LfM3 y LfMRS respectivamente. Al mismo tiempo se incubó leche sin inocular a la misma temperatura (control). Se realizó el seguimiento de la acidificación a través de mediciones de pH. Además, se emplearon métodos cromatográficos para estudiar el perfil de ácidos orgánicos y azúcares (cromatografía líquida de alta presión, HPLC) (Vénica y col., 2013) y los compuestos volátiles (cromatografía gaseosa, SPME-CG) (Peralta y col., 2017).

## Actividad enzimática intracelular

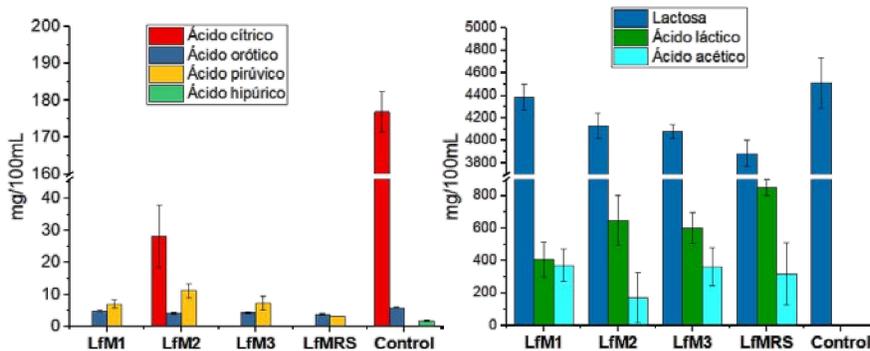
Las actividades enzimáticas lactato dehidrogenasa (LDH) y  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -GAL) fueron determinadas en extractos libres de células (ELC) de la cepa L90 después de su crecimiento en los medios optimizados y en MRS, según la metodología descrita en Peralta y col. (2016).

## Análisis estadístico

Todas las experiencias fueron realizadas por triplicado. Los resultados se analizaron en el software Statgraphics Centurion XVI (prueba gratuita) a través de ANOVA de una vía con un valor de significancia  $p < 0,05$ . La comparación de medias se efectuó por el test LSD de Fischer.

## RESULTADOS

La concentración de lactosa y ácidos orgánicos en las leches fermentadas es representada en la **Figura 1**. En todas las leches fermentadas se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la lactosa en comparación a la leche sin inocular (control). La mayor reducción se produjo en la LfMRS, mientras que la menor disminución fue detectada en la LfM1. En las LfM2 y LfM3 los niveles de lactosa resultaron intermedios. Algunos de los ácidos orgánicos identificados también presentaron diferencias en sus concentraciones. El ácido cítrico disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) en todas las leches fermentadas: en LfM1, LfM3 y LfMRS se observó un consumo total de este ácido, mientras que en LfM2 fue parcialmente consumido. También se verificó una leve reducción del nivel de ácido orótico en todos los casos. El ácido hipúrico fue consumido por completo en todas las leches fermentadas por L90. Por otra parte, se evidenció la producción de los ácidos láctico, pirúvico y acético. Para el ácido láctico, los mayores y menores niveles de producción se observaron en la LfMRS y en la LfM1, respectivamente. Las leches LfM2 y LfM3 mostraron concentraciones intermedias y similares entre ellas. Estos niveles de ácido láctico se correlacionan con los niveles de disminución observados para la lactosa. La producción de ácido pirúvico fue mayor en las leches LfM1, LfM2 y LfM3 respecto a LfMRS. Finalmente, la producción de ácido acético no mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las leches fermentadas.



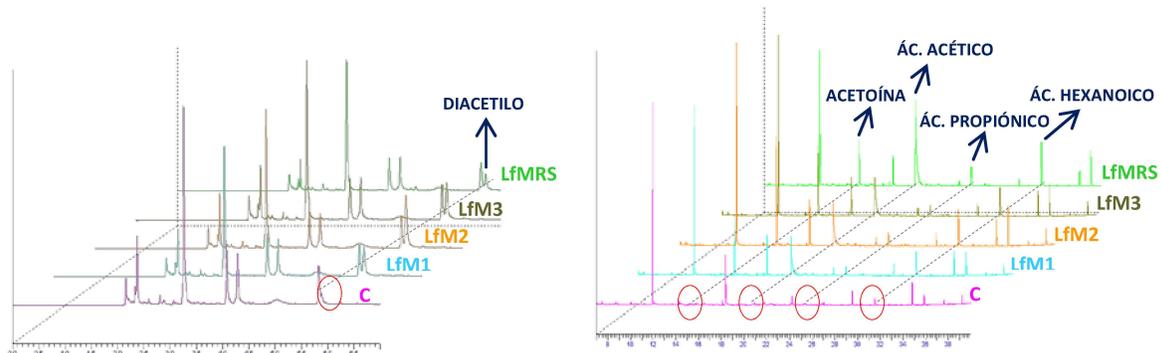
**Figura 1.** Nivel de ácidos orgánicos y lactosa en las leches fermentadas.

Numerosos compuestos volátiles fueron identificados en las leches fermentadas (alcoholes, ácidos, cetonas, aldehídos), detectándose algunas diferencias entre ellas. En la **Figura 2** se muestran los perfiles de compuestos volátiles en las leches fermentadas y

la leche sin inocular (control) para una de las réplicas realizadas. Independientemente del medio de cultivo en el que se desarrolló, *L. paracasei* 90 incrementó los niveles de varios compuestos volátiles, incluyendo diacetilo, acetoína, ácido acético y ácido hexanoico, entre otros. Particularmente, los compuestos diacetilo y acetoína son característicos por su aroma a manteca y su presencia es deseable en una gran variedad de quesos. La capacidad para producir estos compuestos es una característica tecnológica importante de la cepa L90 para su uso como fermento mejorador del flavor en quesos.

Por otro lado, la actividad enzimática  $\beta$ -GAL fue significativamente menor en el ELC proveniente del cultivo en M1 que en el proveniente de MRS, lo que se correlacionó directamente con el nivel de consumo de lactosa observado en estos medios, ya que la  $\beta$ -GAL es la enzima responsable de la hidrólisis de este carbohidrato. La actividad LDH no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) según el medio de cultivo utilizado. Sin embargo, los niveles de esta enzima fueron levemente mayores en los ELC provenientes de MRS, lo que se correlacionó con los menores niveles de ácido pirúvico y mayores niveles de láctico en las LfMRS en

comparación con las otras leches fermentadas, ya que la LDH es la enzima que cataliza la transformación de ácido pirúvico a láctico (datos no mostrados).



**Figura 2.** Perfil de compuestos volátiles en las leches control (C) y fermentadas LfM1, LfM2, LfM3 y LfMRS.

## CONCLUSIONES

Los medios de cultivo alternativos disminuyeron la actividad acidificante del fermento L90, lo que es deseable para el uso del mismo como fermento adjunto de quesería. Por otro lado, la capacidad de producción de compuestos volátiles de interés, característica demostrada para L90 en diversos sistemas modelo luego de su crecimiento en MRS, no fue afectada por el medio de crecimiento empleado.

Los resultados demostraron que los residuos de la industrialización de la soja pueden ofrecer una buena performance como medio de cultivo base para fermentos lácticos a un costo competitivo y con gran potencial de aplicación en quesería.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Coghetto C.C., Vasconcelos C.B., Brinques G.B. & Ayub M.A., 2016.** *Lactobacillus plantarum* BL011 cultivation in industrial isolated soybean protein acid residue. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 941-948.
- Lavari L., Rocco L., Páez R., Zotta T., Cuatrin A., Reinheimer J. & Vinderola G., 2015.** Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 63 (1), 322-330
- Milesi M.M., Wolf I.V., Bergamini C.V., Hynes E.R., 2010.** Two strains of nonstarter lactobacilli increased the production of flavor compounds in soft cheeses. *J. Dairy Sci.* 93, 5020–5031.
- Peralta G.H., Beret M.V., Hynes E.R. & Bergamini C.V., 2018.** Formulación de un medio de cultivo económico para la producción de biomasa de *Lactobacillus paracasei* 90: revalorización de residuos agroindustriales. Libro de resúmenes del VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Córdoba, Argentina.
- Peralta G.H., Bergamini C.V. & Hynes, E.R., 2016.** Aminotransferase and glutamate dehydrogenase activities in lactobacilli and streptococci. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 741–748.
- Peralta G.H., Bergamini C.V., Audero G., Páez R., Wolf I.V., Perotti M.C. & Hynes E.R., 2017.** Spray-dried adjunct cultures of autochthonous non-starter lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 255, 17-24.
- Venica, C.I., Bergamini C.V., Zalazar, C.A. & Perotti, M.C., 2013.** Effect of Lactose Hydrolysis during Manufacture and Storage of Drinkable Yogurt. *Journal of Food and Nutritional Disorders*, 2 (5), 1-7.
- Zhang Y., Vadlani P.V., Kumar A., Hardwidge P.R., Govind R., Tanaka T. & Kondo A., 2015.** Enhanced D-lactic acid production from renewable resources using engineered *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (1), 279-88.