

MEDIO DE CULTIVO FORMULADO A BASE DE PERMEADO DE SUERO DE QUESO PARA LA PRODUCCIÓN DE FERMENTOS UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA QUESERA

Batistela Mara

INLAIN-CONICET, Facultad de Ingeniería Química (FIQ-UNL), Santa Fe

Director: Peralta, Guillermo H.
Codirectora: Bergamini, Carina V.

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: MEDIO DE CULTIVO; PERMEADO DE SUERO; FERMENTOS;
LACTOBACILOS

INTRODUCCIÓN

Los cultivos adjuntos utilizados en quesería son fermentos que se agregan a la leche de elaboración en forma separada o formulados junto con el fermento iniciador con la finalidad de mejorar la calidad de los quesos, diversificar productos, como así también para acelerar el proceso largo y costoso de maduración. En los últimos años, numerosas cepas de origen NSLAB (bacterias lácticas no provenientes del fermento) que poseen actividades enzimáticas que contribuyen a la maduración del queso, y en especial a la formación de aroma, han recibido una creciente atención al momento de la selección de cepas para su uso como fermentos adjuntos (Settanni y Moschetti, 2010, Gobbetti y col., 2015). La mayoría de las cepas de origen NSLAB, que han sido aisladas e identificadas, son del género *Lactobacillus*, principalmente lactobacilos mesófilos (*Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, entre otras) (Gobbetti y col., 2015). En el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN-UNL-CONICET) se han aislado y caracterizado numerosas cepas de origen NSLAB, que han demostrado tener un potencial tecnológico relevante para su uso en quesería, como lo es la producción de aroma, control de bacterias alterantes, resistencia a secado spray y liofilización, entre otras (Milesi y col., 2010, Peralta y col., 2017, Giménez y col., 2021). Sin embargo, los lactobacilos mesófilos, como la mayoría de las bacterias lácticas, son microorganismos fastidiosos desde el punto de vista de sus requerimientos nutricionales ya que no pueden sintetizar muchos de los aminoácidos, vitaminas y bases nitrogenadas necesarias para su óptimo crecimiento (Parente y col., 2017). En consecuencia, para la producción industrial de estos fermentos se requieren medios de cultivos complejos que alcancen las altas exigencias nutricionales de estas bacterias. Estos medios están formulados generalmente por una serie de componentes (fuentes de nitrógeno,

Título del proyecto: Residuos y subproductos de la industria para la formulación de medios de cultivos económicos para la producción de fermentos / Producción de biocatalizadores lácticos para mejorar la calidad en quesos: aprovechamiento de residuos industriales

Instrumento: (PICT-2018-01334 / IO-2017-00036.)

Año de convocatoria: 2018 / 2017

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) / Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación (ASaCTel)

Director: Peralta, Guillermo Hugo

carbono, sales, vitaminas, minerales, etc.) que hacen a estos medios muy costosos. Esto ha motivado a las industrias de fermentos a buscar fuentes de nutrientes alternativas como residuos y subproductos agroindustriales, los cuales tienen una gran disponibilidad y bajo costo.

El suero de queso es un efluente con un alto contenido orgánico y salino, y por su alto valor nutricional ofrece muchas posibilidades de explotación tecnológica. Por otro lado, el suero que no es industrializado es uno de los contaminantes ambientales más severos que existen en la industria láctea. Una alternativa atractiva económicamente, y a la vez amigable para el medioambiente, es la utilización de este residuo como fuente de carbono para el crecimiento de bacterias lácticas de interés. En este sentido, la cepa probiótica *Lacticaseibacillus rhamnosus* 64 ha crecido satisfactoriamente en medios de cultivo a base de suero de queso y permeado de suero de queso (Lavari y col., 2015). Otros trabajos similares han sido reportados (Aguirre-Ezkauriatza, 2010, Amado y col., 2016), los que confirman la aptitud del suero y permeado de quesería para la formulación de medios de cultivos. Aunque muchos estudios sugieren al suero de quesería y permeado de suero de quesos como potenciales materias primas para la formulación de medios de cultivos, la proporción necesaria de estos ingredientes para un crecimiento adecuado es muy variable entre estos estudios y además su eficiencia es muy dependiente de la cepa, por lo que debería evaluarse para cada caso.

OBJETIVOS

En el presente trabajo se planteó optimizar la producción de biomasa de *Lacticaseibacillus rhamnosus* 73 (L73) en un medio de cultivo formulado a partir de permeado de suero de quesería. Además, se evaluó la producción de biomasa de otras cepas de lactobacilos en el medio de cultivo optimizado. Finalmente se valoró la influencia del control de pH durante el crecimiento en la producción de biomasa de L73 en el medio optimizado.

METODOLOGÍA

La cepa L73 es un lactobacilo autóctono caracterizado por tener un perfil enzimático de interés como cultivo adjunto en quesería (Peralta y col., 2016a). Para la optimización de la producción de biomasa se aplicó un diseño central compuesto, constituido por 21 puntos experimentales, 5 de los cuales eran repeticiones del punto central. Los cuatro factores estudiados fueron: permeado de suero, extracto de levadura, $MnSO_4$ y $MgSO_4$. La cepa L73 fue inoculada en cada medio al 2% v/v e incubada a 37°C durante 24h. Al finalizar la incubación se realizaron las determinaciones de recuentos microbiológicos en placa (MRS, 37°C, 48h) y densidad óptica (DO_{600nm}) como medida de biomasa. Los resultados experimentales se procesaron en el programa Design-Expert® 7.0.0 para asignar modelos matemáticos de ajuste. Los coeficientes fueron obtenidos mediante regresión múltiple con eliminación backward ($p < 0,05$) y validados estadísticamente por la prueba de ANOVA y LACK-OF-FIT. Mediante el método de superficie de respuesta y la función deseabilidad se hallaron los niveles necesarios de los factores para lograr la mayor biomasa posible. En la función deseabilidad también se tuvo en cuenta el costo de los componentes. La validación del medio optimizado se realizó por triplicado y además se incluyeron otras 10 cepas de lactobacilos de interés industrial.

El impacto del control de pH durante el crecimiento en la producción de biomasa de L73 en el medio optimizado se evaluó por triplicado realizando fermentaciones batch de 1L a pH libre y a pH controlado utilizando el equipo Sartorius Biostat A plus. Para ello se preparó el medio de cultivo optimizado y se llevó a pH=6,5. La inoculación de la cepa L73 fue al 2% v/v. El desarrollo se llevó a cabo a 37°C y a pH libre o controlado a pH=6,5 utilizando NaOH 2,3N estéril. Durante el proceso se tomaron muestras a distintos tiempos: t_0 (0hs), t_1 (5hs), t_2 (12hs),

$t_3(24\text{hs})$, en las que se analizaron la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ y los recuentos microbiológicos en placa (37°C , 24hs).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El modelo seleccionado para cada respuesta reveló un ajuste significativo ($p < 0,05$) y parámetros de falta de ajuste no significativos. Las gráficas de superficies de respuestas mostraron que los niveles máximos de recuentos microbiológicos (Figura 1A) y $\text{DO}_{600\text{nm}}$ se lograron con los niveles más elevados de permeado de suero y extracto de levadura, mientras que la incorporación de MnSO_4 y MgSO_4 no tuvo un impacto significativo. La función deseabilidad permitió obtener la concentración de permeado de suero ($12,876 \text{ g}/100 \text{ mL}$) y extracto de levadura ($0,3529 \text{ g}/100 \text{ mL}$) necesarias para lograr la máxima producción de biomasa de L73. Durante la validación se obtuvieron niveles altos de recuentos microbiológicos para L73 (promedio= $2,36 \times 10^9 \text{ ufc}/\text{mL}$) confirmando así la respuesta teórica (Figura 1B), y además fueron similares a los niveles obtenidos en el medio comercial MRS. El nivel (ufc/mL) para 8 de las otras 10 cepas de lactobacilos estudiadas, también fue alto (entre $4,47 \times 10^8 - 1,70 \times 10^9$). Por otro lado, la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ alcanzada por la cepa L73 fue alta pero menor que la teórica. En la experiencia a pH controlado y libre, se obtuvo mayor desarrollo de biomasa en condiciones de pH controlado (promedio= $5,28 \times 10^9 \text{ ufc}/\text{mL}$) frente al pH libre (promedio= $2,28 \times 10^9 \text{ ufc}/\text{mL}$). La misma tendencia se observó para los valores de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ (Figura 2).

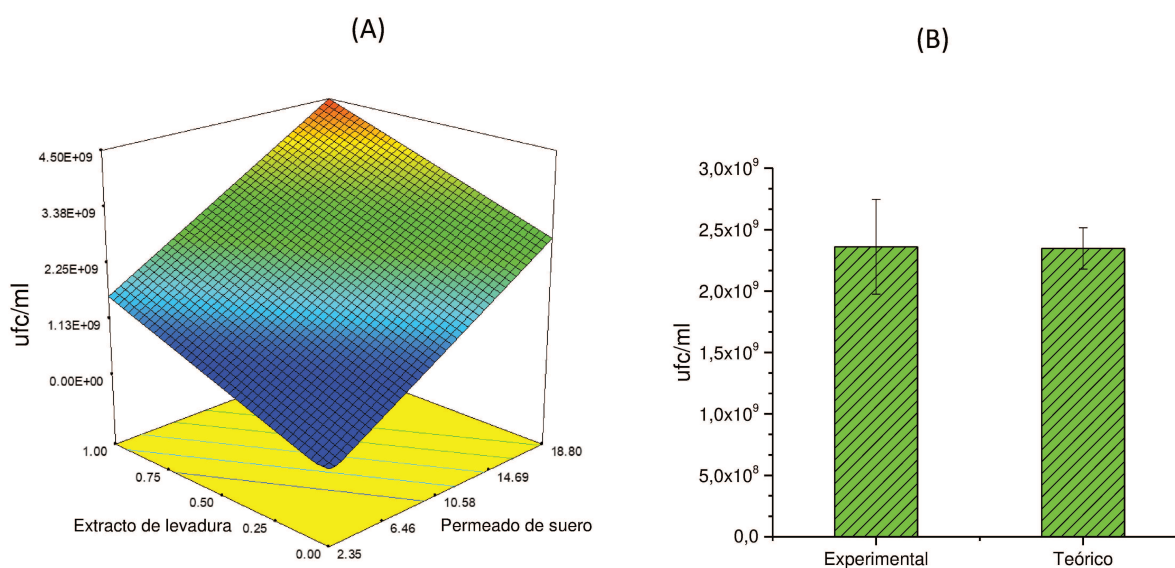


Figura 1. (A) Gráfico de superficie de respuesta de los recuentos microbiológicos en función de la concentración de extracto de levadura y permeado de suero. (B) Gráfico de respuesta teórica y respuesta experimental para recuentos microbiológicos.

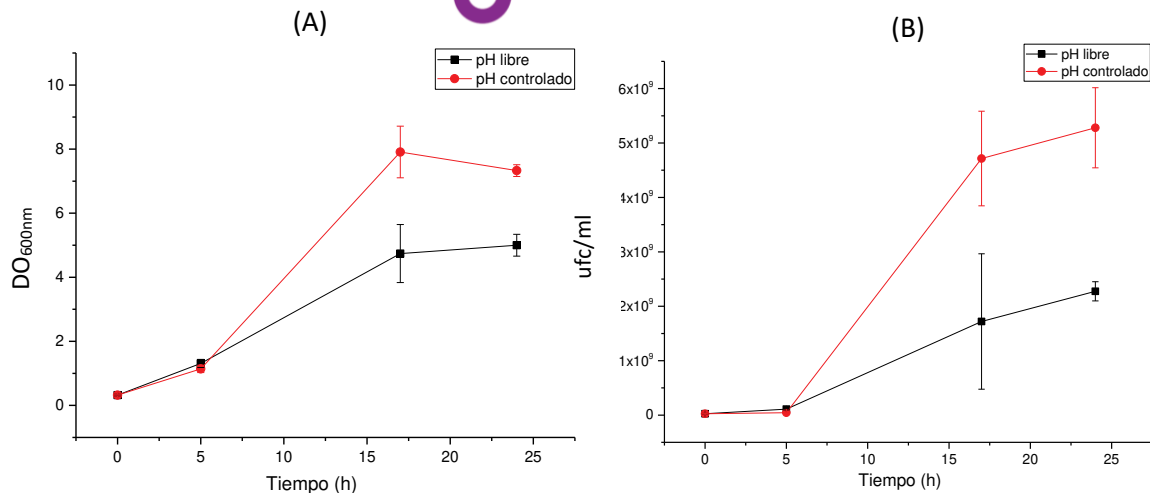


Figura 2. Gráfico de DO_{600nm} (A) y recuentos microbiológicos (B) en función del tiempo de incubación a pH libre (negro) y pH controlado (rojo).

En conclusión, el nivel de recuentos microbiológicos obtenidos para L73 en el medio de cultivo optimizado responde a los requeridos para su industrialización (>1x10⁹ufc/ml). El desarrollo de L73 a pH controlado mejoró significativamente la producción de biomasa respecto al pH libre. Finalmente se destaca la potencialidad del medio de cultivo para el desarrollo de otras cepas de lactobacilos mesófilos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Ezkauriatza E.J., Aguilar-Yáñez J.M., Ramírez-Medrano A., y Alvarez M.M.** 2010. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. *Bioresource Technology* 101, 2837–2844.
- Amado I.R., Vázquez J.A., Pastrana L., y Teixeira J.Á.** 2016. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chemistry*, 198, (1) 54-61.
- Giménez P, Peralta GH, Guglielmotti D, Audero G, Páez R, Hynes ER y Bergamini C.V.** 2021. Preventing undesired eye formation in soft cheese. *International Dairy Journal*, 104958.
- Gobbetti M., De Angelis M., Di Cagno R., Mancini L. y Fox, P.F.** 2015. Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends in Food Science & Technology*, 45, 167-178.
- Lavari L., Rocco L., Páez R., Zotta T., Cuatrin A., Reinheimer J., Parente E., y 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 V., Bergamini C.V., y Hynes E.R.** 2010. Two strains of non-starter lactobacilli increased the production of flavour compounds in soft cheeses. *Journal of Dairy Science* 93, 5020-5031.
- Peralta G.H., Bergamini C.V., y 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. y Hynes E.R.** 2017. Spray-dried adjunct cultures of autochthonous non-starter lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 255, 17-24.
- Settanni L. y Moschetti G.** 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology* 27, 691-697.