

## ESTUDIO PRELIMINAR DE LACTOBACILOS HETEROFERMENTANTES COMO POTENCIALES FERMENTOS PARA ELABORACIONES PANARIAS

**BRAIDA Jéssica<sup>A\*</sup>**

<sup>A</sup>Instituto de Lactología Industrial (UNL-CONICET)  
Facultad de Ingeniería Química - Universidad Nacional del Litoral  
<sup>\*</sup>jesica.braida@gmail.com

**Área:** Ingeniería  
**Sub-Área:** Alimentos  
**Grupo:** X

**Palabras clave:** Lactobacilos heterofermentantes, exopolisacáridos, interacciones microbianas.

### INTRODUCCION

Algunas especies de lactobacilos heterofermentantes (LHe) integran fermentos naturales (masa madre) que participan en la elaboración de pan artesanal. Metabolitos de su fermentación confieren a la masa fermentada ciertas ventajas: mejora en las propiedades organolépticas de los panificados, actividad antimicrobiana frente a flora alterante y/o patógena presente en las harinas, mejoras texturales y de conservación por síntesis de exopolisacáridos (EPS), aumento de la disponibilidad de ciertos nutrientes y de compuestos bioactivos, disminución de compuestos antinutricionales, disminución del contenido de gluten por proteólisis, reducción del índice glucémico debido a la acidificación (Font de Valdez y col., 2010; Guerzoni y col., 2011). Los ácidos láctico y acético producidos inhiben microorganismos patógenos y alterantes y retardan la retrogradación del almidón, fenómeno relacionado con el envejecimiento del pan. La presencia de cepas productoras de exopolisacáridos (EPS) en masa madre utilizada para la elaboración de pan puede ser una herramienta útil para producir el efecto texturizante, contribuyendo así a requerimientos modernos de rotulados "limpios" y demandas por parte de los consumidores de un reducido uso de aditivos. La adición de fermentos lácticos seleccionados a elaboraciones de pan con levadura comercial podría mejorar la textura y vida útil del alimento.

### OBJETIVO

Investigar *in vitro* la capacidad de producción de EPS de cepas de LHe y la interacción microbiana entre ellas y con otros microorganismos de interés, para su posible aplicación como fermentos en la elaboración de pan.

### METODOLOGIA

#### Cepas, condiciones y medios de cultivo

Se utilizaron 16 cepas de LHe provenientes del cepario del INLAIN, identificadas genéticamente como *Lactobacillus fermentum* (12), *Lactobacillus brevis* (2), *Lactobacillus buchneri* (1) y *Weissella cibaria* (1), aisladas de muestras de productos lácteos elaborados por industrias regionales.

Para el estudio de interacciones microbianas se utilizaron cepas de patógenos y

Proyecto: Lactobacilos heterofermentantes: diversidad y potencialidad tecnológica para mejorar la vida útil de pan para celíacos, SECTel 2014, nº 2010-074-14.

Director del proyecto: Dra. María Luján Capra

Director del becario/tesista: Dra. María Luján Capra; Codirector: Mag. Carlos Osella

alterantes potencialmente presentes en alimentos (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*) y la levadura comercial que se usa en panadería.

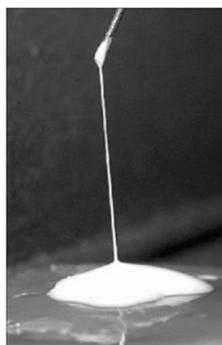
Las cepas de LHe se incubaron a 30 °C por 24-48 h, salvo para *Lb. Fermentum* (37°C). La levadura se incubó a 30 °C y las cepas de patógenos y alterantes, a 37 °C.

Los medios de cultivo usados fueron: MRS caldo *de Man, Rogosa and Sharpe* (Biokar, Beauvais, Francia) para desarrollo, reactivación y recuentos de los LHe. En el estudio de interacciones microbianas, los medios usados fueron: *Sourdough bacteria*, SDB (Corsetti y col, 1996) para los LHe; caldo *Saboureaud* maltosa y agar HyL (Biokar Beauvais, Francia) para levadura comercial; caldo *Brain Heart Infusion*, BHI (Britania, Buenos Aires, Argentina) para *Listeria monocytogenes* y caldo Tripteína Soja, TS (Biokar Beauvais, Francia) para el resto de las cepas.

## Producción de EPS

Ciertas cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) son capaces de producir exopolisacáridos los cuales podrían mejorar la textura y retardar el envejecimiento del pan. La utilización de cepas productoras de EPS en la “masa madre” utilizada para la elaboración de pan sería una herramienta útil para producir el efecto texturizante habitualmente logrado con aditivos de otros orígenes.

El estudio preliminar de la producción de EPS por los LHe se realizó según Di Cagno y col. (2006) por crecimiento (2 y 4 días a 30°C) de las cepas en medio agarizado MRS y MRS adicionado de maltosa (1% p/v) y sacarosa (10% p/v), MRS-MS. La síntesis de EPS se observó por apariencia visual de colonias mucoides como se muestra en la **Figura 1**.



**Figura 1.** Colonia mucoides de una cepa de BAL productora de EPS.  
Fuente: Ruas-Madiedo y col., 2005.

## Interacciones microbianas

Se investigó la actividad de 6 cepas selectas de LHe sobre bacterias alterantes y/o patógenas de origen alimentario potencialmente presentes en la flora de las harinas. También se estudió influencia de esas cepas de LHe sobre levadura comercial, y viceversa, considerando que tanto esas BAL como la levadura serían utilizados conjuntamente como fermentos en elaboraciones de pan. Además se estudió la interacción entre las 6 cepas de LHe entre sí a fin de saber qué combinaciones serían adecuadas en el caso de un fermento multicepa.

Para ello se aplicó el Ensayo diferido de *spot* en medio agarizado utilizando los medios adecuados para cada cepa en estudio. Gotas de cultivos celulares, cuya actividad se estudia, desarrollado (24 h, 30 °C) en medio agarizado, se enfrentaron con cultivos de las cepas potencialmente sensibles inoculadas en medio

semiagarizado y se incubaron (30 °C) por 24 h adicionales. Se consideró inhibición cuando se observó halo claro > 1 mm entorno a las gotas de cultivo cuya actividad se ensayó (Corsetti y col., 1996).

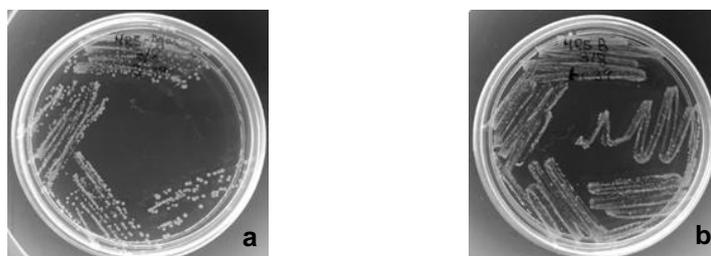
## RESULTADOS

### Producción de EPS

Los cultivos para los que se observaron colonias mucoides fueron: dos cepas de *Lb. fermentum* (22 y 68), dos de *Lb. Brevis* (61 y 66), *W. cibaria* 20 y *Lb. buchneri* 39. Para los LHe restantes no se observaron colonias mucoides por lo que se consideró negativa la producción de EPS. Se logró una mejor filancia en medio MRS-MS. La cepa de *W. cibaria* produjo un chorreado mucoso (jarabe) en MRS-MS (**Fig. 2b**), diferenciándose notablemente con respecto a su desarrollo en MRS (**Fig. 2a**) y al del resto de las cepas en ambos medios (**Fig. 3**). Si bien para el resto de las cepas no se observaron cambios tan notables como para *W. cibaria*20, se dificultó la discriminación de colonias individuales cuando el desarrollo fue en MRS-MS (**Fig. 3b**). La apariencia mucóide fue más fácil de visualizar a los 2 días; ya que a los 4, las colonias se secaron parcialmente.



**Figura 2.** *Weissella cibaria* 20 en medio MRS (a) y MRS-MS (b).



**Figura 3.** *Lactobacillus buchneri* 39 en medio MRS (a) y MRS-MS (b).

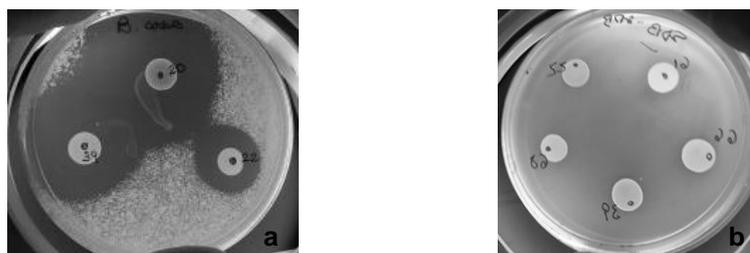
### Interacciones microbianas

No se observó inhibición de las cepas de LHe sobre la levadura ni viceversa, como así tampoco entre las cepas de LHe. Al no observarse interacciones negativas en ningún caso, es posible combinar cualquier cepa o mezcla de cepas de LHe con la levadura en las elaboraciones.

En la actividad de LHe sobre los patógenos y alterantes, se observaron halos de inhibición mayores a 1 mm (**Fig. 4**), es decir que los primeros interaccionaron frente a los segundos inhibiendo su desarrollo, como se muestra en la **Tabla 1**. Las cepas 68 y 22 de *Lb. Fermentum* mostraron inhibiciones menores sobre patógenos/alterantes, mientras que para las cepas 61 y 20 se obtuvieron mayores halos.

**Tabla 1.** Halos de inhibición ( $X \pm DS$  mm) de LHe frente a patógenos y/o alterantes.

Patógeno/Alterante	Cepas					
	20	22	39	61	66	68
<i>Staphylococcus aureus</i> 76	0,7±0,1	0,4±0,0	0,8±0,1	0,9±0,0	0,8±0,1	0,4±0,0
<i>Escherichia coli</i> V517	1,1±0,1	0,5±0,1	0,7±0,3	1,2±0,1	0,7±0,1	0,2±0,0
<i>Salmonella</i> sp. OMS-Ca	0,8±0,1	0,9±0,1	1,0±0,1	1,2±0,1	1,3±0,1	0,4±0,1
<i>Bacillus cereus</i> 3TT1	1,5±0,1	0,6±0,0	1,2±0,2	1,8±0,2	1,0±0,1	0,6±0,1
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	0,9±0,1	0,6±0,1	0,7±0,1	1,3±0,2	0,6±0,1	0,5±0,1
<i>Bacillus licheniformis</i> 514	1,2±0,2	0,4±0,1	1,1±0,1	1,5±0,1	0,8±0,1	0,5±0,1



**Figura 4.** Inhibición de *Bacillus cereus* 3TT1 por tres cepas de BAL (20, 39 y 22) (a); interacción negativa de BAL entre sí (b).

## CONCLUSIONES

El estudio preliminar de EPS permitió seleccionar a las cepas 20, 22, 39, 61, 66 y 68 como candidatas promisorias para integrar fermentos para aplicar en la elaboración de panes. La actividad de LHe sobre los patógenos y alterantes permitirá trabajar con seguridad microbiológica en una matriz no estéril como son las harinas utilizadas como materia prima.

## BIBLIOGRAFIA

**Corsetti A., Gobbetti M. y Smacchi E.** (1996). Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. *Food Microbiology* 13, 447-456.

**Di Cagno R., De Angelis M., Limitone A., Minervini F., Carnevali P., Corsetti A., Gaenzle M., Ciatì R. y Gobbetti M.** (2006). Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 9873-9881.

**Font de Valdez G., Gerez C.L., Torino M.I. y Rollán G.** (2010). New trends in cereal-based products using lactic acid bacteria. En F. Mozzi, R. R. Raya, G.M. Vignolo, (Eds) *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications* (pp.273-287). Singapore: Blackwell Publishing, Wiley Blackwell.

**Guerzoni M.E., Gianotti A., Serrazanetti D.I.** (2011). Fermentation as a tool to improve healthy properties of bread. En V.R. Preedy, R. R. Watson, V. B. Patel, (Eds), *Flour and breads and their fortification in health and disease prevention* (pp.385-393). London, Burlington, San Diego: Academic Press, Elsevier.

**Ruas-Madiedo P. y de los Reyes-Gavilán C.G.** (2005). Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 88, 843-856.