

## MEDIO DE CULTIVO ECONÓMICO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* 90

Beret M. Victoria <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Tesista del Instituto de Lactología Industrial (UNL/CONICET), Santa Fe, Argentina.*

<sup>2</sup> *Facultad de Ingeniería Química (FIQ-UNL), Santa Fe, Argentina.*

*Director: Peralta Guillermo H.*

*Codirectora: Bergamini Carina V.*

Área: Ingeniería

### 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. La producción de biomasa de estas bacterias requiere medios de cultivos muy complejos para satisfacer sus altas exigencias nutricionales. Generalmente están formulados por una serie de componentes (fuentes de nitrógeno, carbono, sales, vitaminas, minerales) que hacen a estos medios muy costosos para el sector industrial.

El uso de residuos/subproductos agroindustriales en procesos biotecnológicos ha recibido una gran atención en los últimos años. En este sentido, varios subproductos de la industria alimentaria, como por ejemplo los derivados de la industria láctea y aquellos provenientes de la industrialización de la soja, se han utilizado para el desarrollo de microorganismos (Lavari y col 2015, Coghetto y col 2016). La gran disponibilidad de estos materiales, junto con sus bajos o incluso muy bajos costos, los convierte en fuentes alternativas de sustratos que podrían usarse para el crecimiento de bacterias. En particular, la producción de concentrado y aislados de proteína de soja, ambos presentes en grandes cantidades en el mercado mundial, genera corrientes líquidas ácidas de residuos ricos en proteínas como resultado de los pasos de lavado y la separación de la proteína de soja aislada (Coghetto y col 2016). Esta fracción líquida, que es descartada como un efluente industrial, contiene azúcares y proteínas de bajo peso molecular, entre otros nutrientes.

El objetivo de este trabajo fue formular un medio de cultivo económico para la producción de biomasa de *Lactobacillus paracasei* 90 (L90) a partir del residuo líquido resultante de la separación de las proteínas de la harina de soja.

### METODOLOGÍA

#### Cepa y condiciones de crecimiento

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

*Lactobacillus paracasei* 90 pertenece a la colección de cultivos del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), y ha sido ampliamente caracterizada en cuanto a sus propiedades tecnológicas y bioquímicas (Peralta et al, 2017). L90 se desarrolló rutinariamente en MRS (Biokar), a 37°C, y se conservó a -80°C en MRS + 15 % v/v de glicerol.

### Medios de cultivo ensayados y pruebas de crecimiento

La producción de biomasa de L90 se ensayó en medios de cultivo formulados a partir de residuos de la industrialización de la soja, adicionados o no con otros nutrientes. El medio de cultivo base fue el residuo líquido ácido procedente de la separación de las proteínas y fibras de la harina de soja. Para ello, la harina de soja se homogeneizó en agua destilada (1+10) y se acidificó con HCl 2N hasta pH 4,5. Las proteínas se separaron por centrifugación (10000g-15min-4°C). El sobrenadante ácido se llevó a pH 8 con NaOH 8M y se sometió a un calentamiento a 100°C durante 10 min. El material insoluble se separó por centrifugación (10000g-15min-4°C) y el sobrenadante se acidificó hasta pH 6,5 y se utilizó como base para la formulación del medio de cultivo. En este medio base, se ensayó la incorporación de extracto de levadura, glucosa y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> como fuentes de nitrógeno, carbono y potasio, a 0,5%, 1% y 0,05% p/v, respectivamente. Se evaluaron 8 medios distintos: un medio base (M8) y siete medios (M1 a M7) adicionados con las 3 fuentes ensayadas, en forma individual, o combinadas de a dos o tres (Tabla 1). Luego de su preparación, los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (121°C-15min).

Para la evaluación de la capacidad de crecimiento de L90 en estos medios, un cultivo fresco de la cepa fue inoculado al 2% en cada uno de ellos, e incubados a 37°C durante 24h. En simultáneo, se realizó la inoculación e incubación en el medio comercial MRS, que se utiliza habitualmente para el crecimiento de lactobacilos. La experiencia se realizó por duplicado.

|                                     | M1   | M2 | M3  | M4   | M5   | M6  | M7   | M8 |
|-------------------------------------|------|----|-----|------|------|-----|------|----|
| Glucosa (%)                         | 1    | 1  | 1   | 1    | 0    | 0   | 0    | 0  |
| Extracto de levadura (%)            | 0,5  | 0  | 0,5 | 0    | 0,5  | 0,5 | 0    | 0  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (%) | 0,05 | 0  | 0   | 0,05 | 0,05 | 0   | 0,05 | 0  |

**Tabla 1.** Nutrientes incorporados a los medios de cultivos ensayados.

### Determinación de biomasa

Luego de la incubación, se realizaron 3 determinaciones analíticas para la medición de biomasa: recuentos microbiológicos en placa, peso seco por unidad de volumen (gravimetría) y densidad óptica de la suspensión celular.

**Recuentos microbiológicos:** se realizaron diluciones decimales en agua de peptona de caseína 0,1 % (p/v) estéril (autoclave, 121 °C - 15 min) y se sembraron en superficie 0,1 mL de las diluciones apropiadas en medio MRS agarizado. Las placas se incubaron 48h a 37°C en microaerofilia. Los recuentos se expresaron en log UFC/mL.

**Peso seco:** se realizó por gravimetría tal como se describe en Coghetto y col (2016). Una alícuota del cultivo fue centrifugado (8000g-15min) en un tubo previamente pesado y el pellet celular fue lavado dos veces con agua destilada estéril y finalmente secado en estufa a 80°C durante 24h. Por diferencia de pesada se determinó la masa de L90.

**Densidad óptica:** se realizó la lectura espectrofotométrica de la suspensión celular a una longitud de onda de 600nm en un espectrofotómetro UV/VIS.

## Determinación de pH

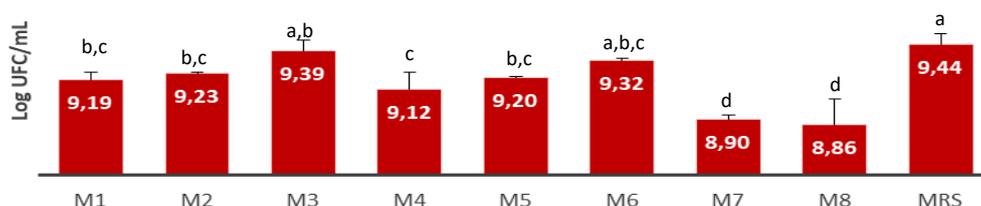
El valor de pH al final de la incubación se midió utilizando un peachímetro Orion (Orion Research Incorporated, Estados Unidos), provisto de un electrodo combinado (vidrio y calomel), que fue calibrado con soluciones tamponadas de pH 4 y 7.

## Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados fue realizado con el software IBM-SPSS Statistics 25. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía para detectar diferencias significativas en los parámetros de crecimiento evaluados en los distintos medios. El método de Tukey se utilizó para comparar las medias con un 95% de confianza.

## RESULTADOS

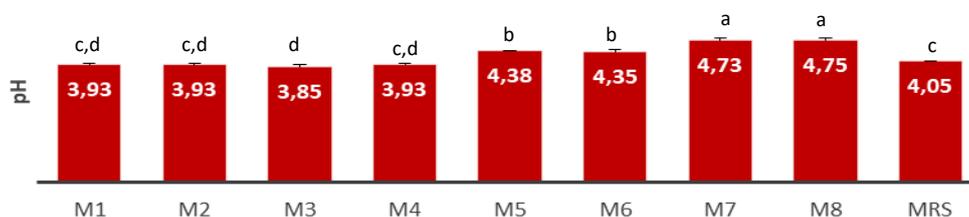
El nivel de *Lactobacillus paracasei* 90 (L90) alcanzado en las diversas formulaciones evaluadas luego de 24 h de incubación se muestra en la Figura 1. En el medio base (M8) en el que no se incorporaron nutrientes adicionales, L90 alcanzó niveles de 8,86 log UFC/mL. De esta manera, los nutrientes (azúcares, aminoácidos, péptidos pequeños, sales) presentes en el residuo resultante de la separación de las proteínas y fibra de soja fueron suficientes para que la cepa L90 pueda lograr un crecimiento apreciable. Sin embargo, la incorporación de glucosa y extracto de levadura, ya sea solos o en combinación, mejoró el desempeño del medio de cultivo hasta niveles comparables al MRS. En efecto, dos de las formulaciones (M3 y M6) fueron equivalentes al MRS en términos de población viable al final de la incubación ( $p < 0,05$ ). Por el contrario, la adición de  $K_2HPO_4$  por sí solo (M7) no mejoró el crecimiento con respecto al medio base (M8). La glucosa es una fuente de carbono fácilmente utilizable por las bacterias lácticas, y el extracto de levadura es una fuente de nitrógeno, aunque también aporta vitaminas; la mejora del crecimiento por la adición de estos nutrientes revela que el medio base era deficiente de los mismos. Coghetto y col (2016) obtuvieron también resultados alentadores al evaluar la producción de biomasa de *Lactobacillus plantarum* BL011 en un medio similar al ensayado en el presente trabajo.



**Figura 1.** Niveles de L90 a las 24h de incubación en los medios de cultivo ensayados y en el medio de cultivo control. Barras con diferente letra indica la presencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Los resultados de peso seco y densidad óptica mostraron en general una tendencia similar a los de los recuentos, aunque se hallaron mayores diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los diversos medios ensayados. Por otro lado, a diferencia de lo observado en los recuentos, los valores obtenidos en MRS fueron mayores ( $p < 0,05$ ) a los observados en los medios formulados, lo que podría atribuirse a la influencia de otros componentes (células muertas, material inerte, polímeros extracelulares y materia orgánica adsorbida) en esta determinación (Arnáiz y col 2000). En todos los medios ensayados, hubo una disminución del pH desde el valor inicial (6,5) hasta niveles que oscilaron entre 4,75 en medios sin glucosa agregada hasta 3,85 en los medios

con suplementación de este carbohidrato (Figura 2). Estos resultados sugieren la metabolización de los azúcares presentes (provenientes de la soja o la glucosa añadida) y producción de ácido láctico, con un consecuente impacto en el pH. Los principales azúcares presentes en la harina de soja son sacarosa, rafinosa y estaquiosa (Hou y col 2000). La mayor acidificación en los medios adicionados de glucosa (M1 a M4) sugiere que este carbohidrato fue más eficientemente utilizado por L90 que los azúcares presentes en el medio base, o que los mismos se encontraban presentes en un bajo nivel. En el mismo sentido, Wang y col (2013) observaron un elevado consumo de glucosa por la cepa *L. casei* Zhang en leche de soja adicionada de este carbohidrato, en comparación con el consumo de otros azúcares presentes: sacarosa, estaquiosa y rafinosa. La capacidad de utilizar alguno de estos azúcares ha sido reportada para cepas de bifidobacterias (Hou y col 2000).



**Figura 2.** Valor de pH a las 24h de incubación en los medios de cultivo ensayados y en el medio de cultivo control. Barras con diferente letra indica la presencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo 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. En particular, el medio base permitió un buen crecimiento de la cepa autóctona L90, que fue mejorado por la adición de glucosa y extracto de levadura. Este trabajo se continúa actualmente con el objetivo de optimizar la formulación y evaluar posteriormente la actividad metabólica de la cepa luego del crecimiento en estos medios formulados.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Arnáiz C., Isac L., Lebrato J.** 2000. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. Tecnología del Agua, 205, 45-52.
- Champagne C.P., Green-Johnson J., Raymond Y., Barrette J., Buckley N.** 2009. Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophiles*. Food Research International, 42, 612-621.
- 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.
- Hou J.W., Yu R.C., Chou C.C.** 2000. Changes in some components of soy milk during fermentation with bifidobacteria. Food Research International, 33 (5), 393-397.
- Lavari L., Rocco L., Páez R., Zotta T., Cuatrin A., Reinheimer J., Parente E., 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.
- 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.
- Wang J., Wu R., Zhang W., Sun Z., Zhao W., Zhang H.** 2013. Proteomic comparison of the probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang cultivated in milk and soy milk. Journal of Dairy Science, 96, 5603-5624.