



FERMENTO LÁCTICO PARA MEJORAR PANES SIN GLUTEN. SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA PRODUCIR BIOMASA.

Paulón, Florencia¹

¹Instituto de Lactología Industrial (INLAIN)

Directora: Capra, M. Luján;

Codirectora: Quiberoni, Andrea

Área: Ingeniería

INTRODUCCIÓN

Los productos sin gluten no están ampliamente disponibles, son costosos, menos palatables y nutricionalmente más pobres que el pan de trigo tradicional (Arendt y col., 2011). El reemplazo de gluten en panificación es un desafío ya que el mismo otorga las propiedades viscoelásticas a la masa y su ausencia genera panes con baja calidad tecnológica.

Algunas especies de bacterias ácido lácticas (BAL) heterofermentantes influyen positivamente en varios aspectos de la calidad de los panificados. La cepa *Weissella cibaria* 20 fue utilizada en un trabajo previo como fermento en la elaboración de un pan libre de gluten, demostrando aptitud para el mejoramiento sensorial y estructural del producto obtenido (Peverengo, 2018). El uso de esta cepa podría resultar una alternativa natural a las metodologías actualmente disponibles para el mejoramiento de panes.

Un paso crítico para el uso masivo de microorganismos es su producción a gran escala. En laboratorio el medio de cultivo más ampliamente utilizado para el crecimiento de bacterias lácticas es el medio formulado por *de Man, Rogosa and Sharpe* (MRS). Si bien la eficiencia de producción de biomasa de este medio en su versión comercial es muy buena, su uso a escala piloto o industrial no resulta viable debido a su alto costo. Para sortear este obstáculo se pretende hallar un medio económico y libre de TACC con el fin de propagar la biomasa para un posterior escalado a la producción industrial del fermento. Existen estudios previos sobre medios de crecimiento económicos en base a sustratos lácteos como suero de queso y permeado de suero de queso (Lavari, 2016). Otra opción para la producción económica de biomasa, es evaluar la capacidad de la cepa de desarrollar en medios preparados en base a cereales libres de gluten.

OBJETIVOS

- Formular medios de cultivo de bajo costo y libres de TACC para la obtención de biomasa de una cepa de *Weissella cibaria* 20, en vistas a una producción a gran escala.
- Evaluar la productividad de los medios formulados y compararla con la obtenida en un medio comercial de uso habitual en laboratorio.

METODOLOGÍA

Cepa, condiciones y medios de cultivo

Se empleó la cepa *Weissella cibaria* 20 (W20) perteneciente al Ceparío del INLAIN la cual fue cultivada en caldo MRS (Biokar, Beauvais, Francia) a temperatura óptima (T_{opt}) de 30 °C durante 16-18 h (*overnight*, o.n.). Los recuentos microbiológicos se determinaron por siembra de diluciones adecuadas en superficie en medio MRS agarizado, incubándose por 24 h a 30 °C en microaerofilia.

Medios de cultivo para producir biomasa

Título del proyecto: "Pan mejorado para celíacos por adición de bacterias lácticas. Optimización de la preparación del cultivo *starter*" Código de Proyecto: IO-2017- 00096

Instrumento: Investigación Orientada.

Año de convocatoria: 2017

Organismo financiador: Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación (ASaCTel)

Directora: María Luján Capra



a) Medio en base a suero de quesería, SQ

Se formuló según lo indicado por Zacarías (2015) con ligeras modificaciones, ensayando distintas concentraciones (1-5% p/v) de suero de quesería (Verónica, Lehmann) siempre adicionado de extracto de levadura (Britania, Buenos Aires), EL, al 5% p/v; en presencia de glucosa (Cicarelli, San Lorenzo) (1% p/v) (SQ-EL-G) y en su ausencia (SQ-EL). Además, se ensayó un medio semejante al MRS (Zacarías, 2015), donde el lactosuero reemplazó las fuentes de nitrógeno extracto de carne y tripteína del medio comercial (MRS-SQ). Al mismo se lo sometió a un tratamiento enzimático con pepsina porcina 0,3% (p/v) (Merck, Buenos Aires) para facilitar la asimilación de la fuente nitrogenada por W20. En ambos casos, con y sin hidrólisis, los medios se suplementaron con glucosa (1% p/v).

b) Hidrolizados obtenidos a partir de harinas de sorgo, HS, y de trigo sarraceno, HTS

Hidrolizados de dos harinas sin gluten (Praga S.R.L., Córdoba) preparados acorde a lo indicado por la Dra. Gerez (comunicación personal, 2016) se ensayaron con distintas adiciones: i) EL al 5% (p/v); soluciones estériles de azúcares agregadas post-esterilización ii) en forma individual (concentración final 1% p/v): glucosa (G), sacarosa (Cicarelli, San Lorenzo) (S), maltosa (M) (Biopack, Buenos Aires) o fructosa (Anedra, San Fernando) (F); o iii) en combinaciones: glucosa-maltosa (G-M)) y los 4 azúcares juntos (4A) (cada uno en concentración final 0,5 y 0,25 % p/v, para G-M y 4A respectivamente).

c) Medio en base a permeado de suero de quesería, PSQ

El PSQ (Arla Foods, Porteña, Córdoba, Argentina) se formuló según lo indicado por Lavari (2016), ensayándose sin suplementar (PSQ) y suplementado con glucosa 1% (p/v) (PSQG).

d) Medio *Sour Dough Bacteria*, SDB

Este medio, formulado específicamente por Kline y Sugihara (1971), se preparó incorporando las siguientes modificaciones: i) sin ajuste de pH (6,5); ii) con ajuste (por adición de HCl 5 M) a pH 5,6. En ambos casos, se ensayaron con agregados post-esterilización de soluciones estériles de glucosa o maltosa al 1% p/v (concentración final). Todos los medios fueron esterilizados en autoclave por 15 min a 1 atm de presión.

Ensayo para la selección del medio de cultivo

Como procedimiento estándar, cultivos activos (dos o.n. sucesivos) de la cepa de W20 desarrollada en caldo MRS y lavados (dos veces) con *buffer* fosfato (50 mM, pH 7) se inocularon al 2% (v/v) en los medios a ensayar y en caldo MRS (control). Se incubó en baño termostático a 30 °C y se tomaron muestras a tiempo inicial y a diferentes tiempos. Se determinaron pH y recuentos de células viables en agar MRS.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

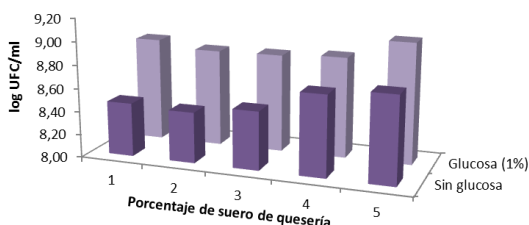


Figura 1. Efecto del porcentaje de suero de quesería y la adición de glucosa (1%) en el desarrollo de W20 (24 h, 30 °C) en el medio SQ.

Para todas las concentraciones de lactosuero probadas, en el medio SQ-EL el crecimiento de W20 fue inferior que en SQ-EL-G (Figura 1); la condición suero de quesería al 5% (p/v) en presencia de glucosa fue en la que se recuperó mayor cantidad de células ($1,1 \cdot 10^9$ UFC/ ml) (Figura 1) por lo cual fue la elegida para usar en las siguientes experiencias.

Con respecto a los medios MRS-SQ, con y sin tratamiento enzimático, se comportaron igual entre sí y no difirieron respecto al SQ-EL-G luego de 20 h de incubación (datos no mostrados). Por

ello, por su formulación compleja y costosa, y por ser laboriosas sus preparaciones, el MRS-SQ (en sus dos variantes) fue descartado.

Los estudios realizados en ambos hidrolizados de harina sin gluten mostraron, luego de 20 h de incubación, que la adición de EL fue la que mayor crecimiento celular produjo, corroborándose el requerimiento de fuentes nitrogenadas accesibles por parte de las BAL. La mayor diferencia con respecto a los demás aditivos fue en HS (9 órdenes log) (Figura 2). Se observó un comportamiento inesperado respecto al pH en ambos medios, donde se esperaba que mayores disminuciones de pH se correspondieran con mayor desarrollo de W20. Sin embargo, donde se registraron medidas de pH menor (3,7-3,9) los recuentos fueron algo bajos, y mayor fue el recuento en los hidrolizados con EL donde el pH alcanzado luego de 20 h de incubación se mantuvo alto (5,8-5,9) en comparación con el resto (Figura 2). Esto se puede deber a la capacidad amortiguadora probablemente producida en el medio al incorporar el EL, similar a lo que ocurre en el MRS, lo que permite que la célula siga creciendo un poco más y no se inhiba por su propia acidificación.

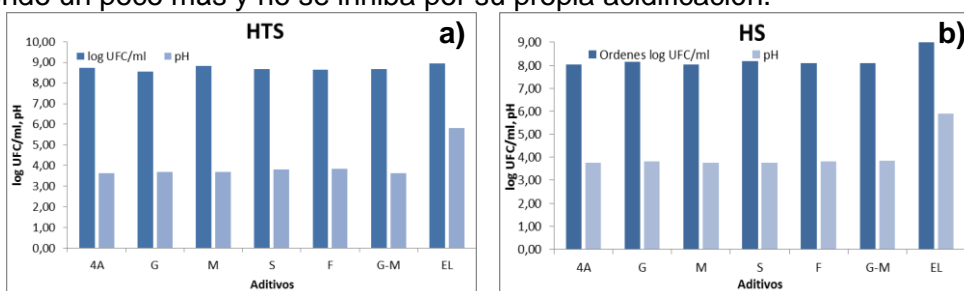


Figura 2. Efecto de los distintos aditivos (G: glucosa, M: maltosa; S: sacarosa, F: fructosa, EL: extracto de levadura y combinaciones de 2, G-M, o 4 azúcares, 4A) en a) HTS y b) HS con respecto al desarrollo (20 h, 30 °C) de W20.

Si bien ambos hidrolizados adicionados de extracto de levadura permitieron lograr recuentos celulares elevados, la complicación de la preparación y el extenso tiempo dispensado en ello son aspectos negativos al momento de la elección del medio.

El crecimiento de W20 en PSQ, en el medio suplementado con glucosa (1%) y el medio sin suplementar, no mostró diferencias hasta las 4 h de incubación; a las 6 h el recuento en PSQG fue de 0,7 órdenes logarítmicos mayor respecto al medio sin suplementar, obteniéndose el máximo (9,6 órdenes logarítmicos) a ese tiempo de incubación (Figura 3).

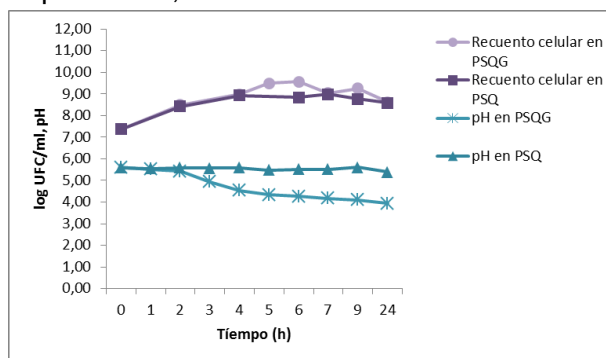


Figura 3. Crecimiento de W20 en el medio permeado de suero de quesería suplementado con glucosa (1%), PSQG, y sin suplementar, PSQ, durante 24 h de incubación a 30 °C.

El desarrollo de W20 en medio PSQG a las 5 h de incubación ya fue satisfactorio, y se mantuvo alrededor de ese valor hasta las 9 h. A las 24 h de incubación, el recuento fue de 8,6 órdenes logarítmicos (Figura 3).

El pH en el medio PSQG comenzó a descender a las 2 h y continuó haciéndolo marcadamente hasta las 24 h de incubación donde su valor fue mínimo (3,9); a diferencia con el medio PSQ, donde se mantuvo alrededor del mismo valor (5,5) en toda la

experiencia (Figura 3).

Los recuentos celulares en las distintas condiciones ensayadas en el medio SDB (Tabla 1) no fueron satisfactorios comparados con el crecimiento en el MRS comercial (10^9 UFC/ml), por lo que se lo descartó como medio eficiente para propagar biomasa.

Finalmente se adoptó el permeado de suero suplementado con glucosa y demás aditivos como un potencial candidato para la producción de biomasa a escala industrial debido a que permitió la producción de 10^9 UFC/ml de células de W20 en tan solo 4 h (Figura 3),

Tabla 1. Recuentos microbiológicos de W20 en el medio SDB con distintas combinaciones de pH y aditivos, alcanzados luego de 24 h de incubación a 30 °C.

SDB	UFC/ml	
	pH 5,6	pH 6,5
Maltosa	$2,3 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^8$
Glucosa	$2,1 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8$

comparable con el caldo MRS comercial. Este subproducto de la elaboración de quesos es altamente contaminante, por lo que su utilización contribuye a paliar, al menos de forma parcial, la problemática de su

disposición final debido a la alta DBO y DQO de este sustrato y al mismo tiempo permite producir biomasa de cultivos de alto valor agregado a partir de medios económicos. A su vez su preparación es menos laboriosa y más rápida respecto a la de los hidrolizados de cereales sin TAAC y el crecimiento de W20 alcanzado, es mayor.

El SQ logró una producción celular similar también al MRS comercial. Sin embargo, las

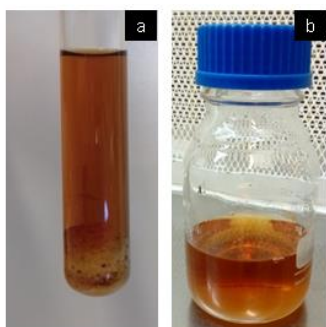


Figura 4. a) Medio SQ
b) medio PSQ, ambos post-esterilización.

proteínas presentes en el medio precipitan luego del tratamiento térmico de esterilización generando inconvenientes durante el uso del medio de cultivo y la posterior disposición de la biomasa obtenida, ventaja que presenta el PSQ debido a que se obtiene un medio límpido (Figura 4a y 4b). Otro atributo a favor del PSQ con respecto al SQ es el costo debido al gran valor que hoy tiene la proteína de suero ya sea como concentrado de proteínas de suero (WPC, del inglés *whey protein concentrate*) o aislados de proteínas de suero (WPI, del inglés *whey protein isolate*), siendo el permeado un efluente del proceso de ultrafiltración mediante el cual se obtienen estas fracciones proteicas. Debido a esto, el PSQ se podría revalorizar como un medio de cultivo más económico que el SQ.

Este enfoque tiene dos ventajas: el uso de un efluente altamente contaminante y la posibilidad de contar con un medio de cultivo eficiente, de bajo costo y libre de gluten para propagar la biomasa de *W. cibaria* 20 a mayor escala.

BIBLIOGRAFÍA

- Arendt E. K., Moroni A., Zannini E.,** 2011. Medical nutrition therapy: use of sourdough lactic acid bacteria as a cell factory for delivering functional biomolecules and food ingredients in gluten free bread. *Microbial Cell Factories*, 10 (Suppl 1):S15, 1-9.
- Kline L., Sugihara T. F.,** 1971. Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. *Applied Microbiology*, 21, 459-465.
- Lavari L.,** 2016. Secado *spray* aplicado al desarrollo de cultivos probióticos a partir de cepas de lactobacilos autóctonos. Tesis para acceder al grado de Dr. en Ciencias Biológicas (FBCB-UNL). INTA-Rafaela e INLAIN (UNL-CONICET), Santa Fe, Argentina.
- Peveengo M. R.,** 2018. Caracterización tecnológica de lactobacilos heterofermentantes. Potencialidad de aplicación en masas panarias para prolongar la vida útil de pan para celíacos. Tesina de Licenciatura en Biotecnología (FBCB-UNL). INLAIN (UNL-CONICET), ITA, FIQ-UNL, Santa Fe, Argentina.
- Zacarias M. F.,** 2015. Bifidobacterias de leche materna aspectos microbiológicos, tecnológicos y funcionales. Tesis para acceder al grado de Dr. en Ciencias Biológicas (FBCB-UNL). INLAIN (UNL-CONICET), FIQ-UNL, Santa Fe, Argentina.