

SEGURIDAD Y VALORIZACIÓN DE BACILOS LÁCTICOS HETEROFERMENTANTES CON APTITUD TECNOLÓGICA COMO FERMENTOS PARA PANES CON Y SIN GLUTEN

Lancelle Cedrolla, María Verónica

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN)

Directora: Capra, María Luján

Codirectora: Quiberoni, Andrea

Área: Ciencias Biológicas

Palabras Claves: Bacilos lácticos heterofermentantes, Cultivos bioprotectores,
Resistencia antimicrobiana

INTRODUCCIÓN

La masa madre, compuesta por bacterias lácticas (BAL) y levaduras, se ha utilizado desde la antigüedad para producir pan de centeno y trigo. Su uso universal puede atribuirse a la mejor calidad, propiedades nutricionales y vida útil de los panes así fermentados (Arendt y col. 2011). La adición de fermentos lácticos seleccionados a elaboraciones con levadura comercial podría mejorar las características organolépticas y la vida útil del alimento, sin adición de químicos. Existen pocos cultivos comerciales de BAL para panificación. En nuestro país, las empresas proveedoras de fermentos no cuentan con cultivos iniciadores (*starter*) lácticos para elaborar productos panificados. Entre las BAL aisladas de masa madre, la acción ejercida por los lactobacilos es significativa, en particular, de ciertos bacilos lácticos heterofermentantes (BLH).

En investigaciones previas, se aislaron e identificaron diversos BLH, entre los cuales se seleccionaron seis, con aptitudes tecnológicas para crecer en masas panarias con y sin gluten. Las cepas fueron identificadas como *Limosilactobacillus fermentum* (LF22 y LF68), *Levilactobacillus brevis* (LB61 y LB66), *Lentilactobacillus buchneri* (LBu39) y *Weissella confusa* (W20). Las tres primeras especies figuran en el inventario de microorganismos con historial documentado de uso en alimentos confeccionado por la Federación Internacional de Lechería (*International Dairy Federation*, IDF) en colaboración con la Asociación Europea de Alimentos y Cultivos Alimentarios (*European Food & Feed Cultures Association*, EFFCA, <https://effca.org/>) (Mogensen y col., 2002). *W. confusa*, incorporada en la primera actualización del listado (Bourdichon y col., 2012), no posee estatus GRAS (Generally Recognized as Safe; United States, Food and Drug Agency, FDA) ni QPS (*Qualified Presumption of Safety*; *European Food Safety Authority*, EFSA). La utilización de nuevas cepas con gran potencial biotecnológico y su aplicación como *starter* en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales debe contemplar estudios de seguridad a nivel de cada cepa seleccionada (Quattrini y col., 2019).

Título del proyecto: FERMENTO LÁCTICO PARA MEJORAR PANES SIN GLUTEN.
OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES Y PROCESOS PARA PRODUCIR BIOMASA

Instrumento: PICT

Año de la convocatoria: 2018

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)

Director/a: Capra, María Luján; Co-directora: Daniela Guglielmotti.

OBJETIVO

Estudiar aspectos de seguridad y atributos funcionales de seis cepas de bacilos lácticos heterofermentantes para su aplicación como cultivos *starter* de productos panificados.

METODOLOGÍA

Producción de aminas biógenas (AB)

La producción de las AB (histamina, cadaverina, putrescina y tiramina) se investigó realizando estrías de las cepas en medio agarizado formulado por Bover-Cid y Holzapfel (1999) conteniendo sus aminoácidos (AA) precursores histidina, lisina, ornitina y tirosina (1% p/v) e incubando a 30 °C por 2-5 días en microaerofilia. Previamente, los cultivos se repicaron 3 veces en caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, Biokar, Beauvais, Francia) conteniendo los AA precursores y de fosfato de piridoxal para permitir la inducción de las descarboxilasas. La aparición de un halo púrpura en torno al crecimiento en la estría (por viraje del indicador de pH) representa un resultado positivo.

Resistencia a antibióticos (ATB)

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM, µg/ml) por el método de diluciones en microplaca (Cardamone y col., 2011). La CIM es la concentración mínima de ATB necesaria para inhibir totalmente el crecimiento bacteriano. Una cepa bacteriana es susceptible cuando su CIM es igual o inferior al valor de corte establecido para la especie, o resistente si no se inhibe a una concentración mayor a tal valor. Dado que no se han indicado valores de corte para el género *Weissella*, se consideraron los reportados para BLH y para *Leuconostoc*, por ser los más cercanos a nivel filogenético (Collins y col., 1993). Se ensayaron gentamicina, tetraciclina, eritromicina, ampicilina, streptomycin, cloranfenicol, kanamicina y vancomicina (control positivo) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.). Cultivos activos (16-18 h, 30 o 37 °C) de las cepas se diluyeron (hasta 10⁴ UFC/ml) en caldo LSM (*LAB susceptibility test medium*, 10% MRS y 90% caldo Iso-sensitest (Oxoid, Hampshire, England) (Klare y col., 2005). Los resultados se interpretaron según los valores de corte adoptados por EFSA (Rychen y col., 2018).

Actividad antimicrobiana

La inhibición de bacterias patógenas/alterantes (*Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*) por las cepas de BLH se estudió por el método diferido en spot en agar MRS y SBD (*Sourdough Bacteria*) (Corsetti y col., 1996). Sobrenadantes libres de células (SLC, obtenidos mediante centrifugación a partir de cultivos activos de las cepas de BLH) sometidos a tratamiento térmico (121 °C, 15 min), hidrólisis con proteasas (pepsina y proteinasa K), neutralización (pH 7) y sin tratamiento (control) se usaron para evaluar la naturaleza de los compuestos inhibidores (método de difusión en agar; Cardamone y col., 2011).

Habilidad de metabolizar el gluten

Se estudió la capacidad de las cepas de BLH de crecer en un medio que posee gluten como única fuente de nitrógeno, según Gerez y col. (2006) con modificaciones. Cultivos activos crecidos en caldo MRS, lavados (solución tampón fosfato) y suspendidos (10⁶ UFC/ml concentración final) en un medio líquido formulado en base a gluten de harina de trigo (GBM, *gluten based medium*; Sigma), se incubaron a 30 °C. A tiempo inicial, 4, 6 y 24 h, se determinaron pH y recuentos bacterianos (agar MRS, 30 o 37 °C, 48 h).



RESULTADOS

Las cepas LF22, LF68 y W20 no produjeron AB a partir de los AA ensayados. Por otro lado, ciertas cepas produjeron AB: LBU39 (ornitina), LB61 (tirosina, lisina y ornitina) y LB66 (ornitina y tirosina) (Fig. 1).

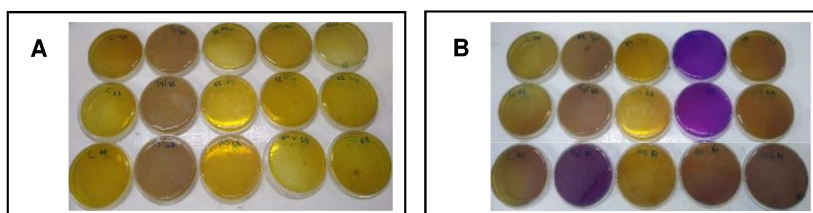


Fig.1. Capacidad de los BLH para producir AB, a partir de los aminoácidos precursores (histidina, lisina, ornitina y tirosina). Ausencia (A) y presencia (B) de producción de AB, visualizado por viraje del indicador del amarillo (negativo) al púrpura (positivo).

En general, los BLH presentaron valores de CIM por debajo de los valores de corte, con algunas excepciones en donde los mismos fueron superiores. Este hecho requiere la realización de estudios posteriores.

| Cepa | Concentración inhibitoria mínima (CIM, µg/ml) | | | | | | | |
|-------|---|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|
| | VAN | GEN | TET | EST | ERI | AMP | CLF | KAN |
| W20 | >256 | 4 | 16 | 32 | <0,125 | 1 | 4 | 64 |
| LBu39 | >256 | <1 | 8 | <4 | <0,125 | 1 | 2 | 16 |
| LB61 | >256 | <1 | 32 | 32 | <0,125 | 4 | 8 | 32 |
| LB66 | >256 | <1 | 16 | 8 | <0,125 | 1 | 2 | 16 |
| LF22 | >256 | <1 | 32 | <4 | <0,125 | 0,5 | 4 | 16 |
| LF68 | >256 | <1 | 32 | 16 | <0,125 | 0,5 | 4 | 32 |

Tabla 1. Valores de CIM (µg/ml) para diversos ATB para las cepas de BLH ensayadas.

VAN: vancomicina, GEN: gentamicina, TET: tetraciclina, ERI: eritromicina, AMP: ampicilina, EST: estreptomicina, CLF: cloranfenicol y KAN: kanamicina

La capacidad antimicrobiana de los BLH fue mayor en agar MRS que en SDB (Fig. 2), probablemente como consecuencia de un mejor desarrollo de las cepas en MRS.

Entre los patógenos testeados, *L. monocytogenes* fue el más susceptible. Por su parte, W20 demostró la mayor habilidad inhibitoria frente a todos los patógenos/alterantes ensayados (Fig. 3).

La capacidad antimicrobiana de los SLC de todos los BLH frente a los patógenos/alterantes testeados desapareció solo cuando éstos fueron neutralizados, por lo que el poder inhibitorio de los mismos está relacionado con los componentes ácidos presentes, particularmente ácidos láctico y acético (Fig. 4).

Las seis cepas de BLH utilizaron el gluten de trigo presente en un medio de cultivo que lo contiene como única fuente de nitrógeno, observándose aumentos de entre 0,7 y 2,7 órdenes logarítmicos UFC/ml.

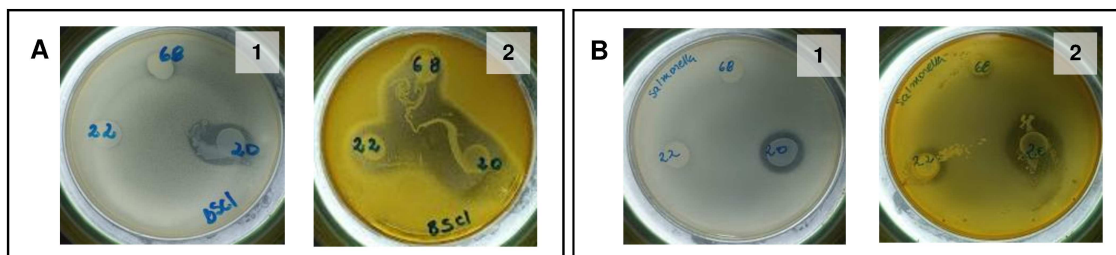


Fig. 2. Inhibición de *B. subtilis* (A) y *Salmonella* sp. (B) por LF22, LF68 y W20 en SDB (A1 y B1) y en MRS (A2 y B2) mediante el método de *spot* diferido en medio agarizado.

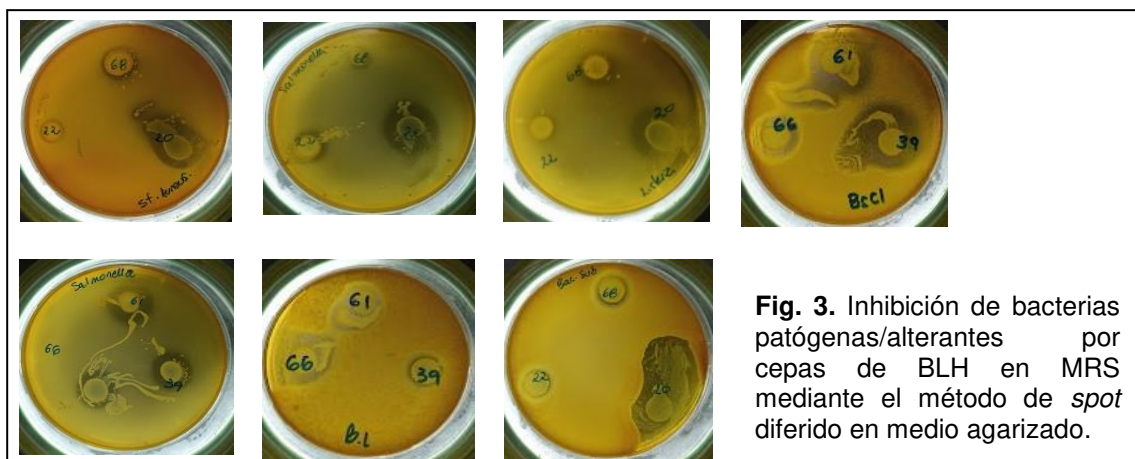


Fig. 3. Inhibición de bacterias patógenas/alterantes por cepas de BLH en MRS mediante el método de *spot* diferido en medio agarizado.

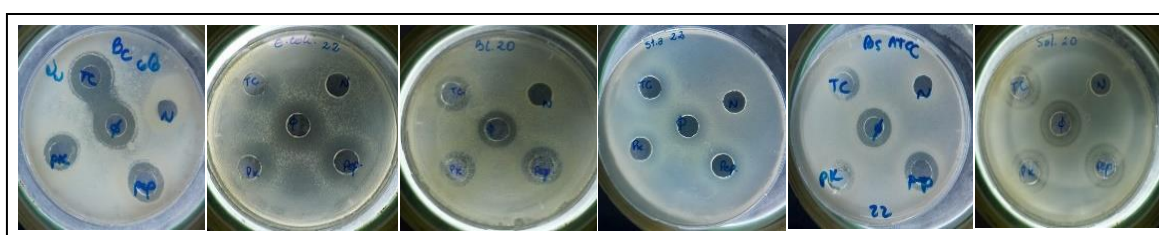


Fig. 4. Inhibición de los SLC de LB66, LF22 y W20, tratados con: proteinasa K (Pk), pepsina (pep), calentado (Ø), neutralizado (N) y sin tratamiento (TC), frente a cepas de patógenos/alterantes (*B. cereus*, *E. coli*, *B. licheniformis*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *Salmonella* sp.).

CONCLUSIONES

La actividad antibacteriana observada valoriza a los BLH como cultivos bioprotectores, sumando a su rol principal de cultivos *starter*. *L. fermentum* LF22, LF68 y W20 no produjeron AB y en general, presentaron valores de CIM por debajo de los valores de corte, con excepción de tetraciclina. Para el género *Weissella*, EFSA aún no ha definido valores de corte de CIM, por lo que estudios sobre ese género cobran importancia adicional. Según los resultados obtenidos, W20 se perfila como candidata segura y con atractivas propiedades funcionales para actuar como cultivo *starter* de productos panificados.

BIBLIOGRAFIA BÁSICA

- Arendt, E.K., Moroni, A., Zannini, E., 2011. *Microb. Cell Factories* 10 (Suppl 1):S15.
- Bourdichon, F., Boyaval, P., Casaregola, S. y col. 2012. *IDF Bulletin*, N° 455, 21–61.
- Bover-Cid, S., Holzapfel, W.H., 1999. *Int. J. Food Microbiol.* 53, 33–41.
- Cardamone, L., Quiberoni, A., Mercanti D.J. y col. 2011. *Dairy Sci. Technol.* 91, 457–470.
- Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J. y col. 1993. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 595–603.
- Corsetti A., Gobbetti M. y Smacchi E. 1996. *Food Microbiol.* 13, 447–456.
- Gerez, C.L., Rollán, G.C., de Valdez, G.F. 2006. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 459–464.
- Klare, I., Konstabel, C., Müller-Bertling, S. y col. 2005. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8982–8986.
- Mogensen G., Salminen S., O’Biren J. y col., 2002. *IDF Bulletin*, N° 377, 1–10.
- Quattrini, M., Korcari, D., Ricci, G., Fortina, M.G. 2019. *J. Appl. Microbiol.* 128, 500–512.
- Rychen G., Aquilina G., Azimonti G. y col. 2018. *EFSA Journal* 16:5206.