



XVIII CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

IX SIMPOSIO INTERNACIONAL DE NUEVAS TECNOLOGÍAS

VII SIMPOSIO LATINOAMERICANO SOBRE HIGIENE Y CALIDAD DE ALIMENTOS

V SIMPOSIO DE INNOVACIÓN EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Libro de trabajos completos

XVIII CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

XVIII CyTAL[®] 2023

Innovación, sustentabilidad y productividad
en la transformación del sistema alimentario



Asociación Argentina
de Tecnólogos Alimentarios



FACULTAD DE INGENIERÍA
Y CIENCIAS AGRARIAS



Agencia I+D+i

Libro de trabajos completos XVIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos XVIII CyTAL® 2023 / Stella Maris Alzamora, María del Pilar Buera, Ricardo Castellano, Paula Sol Pok, Silvia Mónica Raffellini, Emilia Elisabeth Raimondo, Susana Emilia Socolovsky, Sergio Ramón Vaudagna, Susana Leontina Vidales, Angela Zuleta

1a ed compendiada. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios - AATA, 2024.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-47615-4-5

1. Tecnología de los Alimentos. I. Alzamora, Stella Maris [et al.].

CDD 641.3002

ISBN 978-987-47615-4-5



9 789874 761545

4040. SEGURIDAD Y VALORIZACIÓN DE CEPAS DE BACILOS LÁCTICOS HETEROFERMENTANTES CON FUNCIONALIDAD TECNOLÓGICA, COMO INTEGRANTES DE UN FERMENTO LÁCTICO PARA PRODUCTOS PANIFICADOS CON Y SIN GLUTEN

Gómez, Alicia E.¹; Lancelle Cedrolla, María V.²; Guglielmotti, Daniela M.¹; Quiberoni, Andrea¹; Capra, María L.¹

1. *Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET), Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.*
2. *Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.*

E-mail: mcapra@fcb.unl.edu.ar

RESUMEN

Ciertos bacilos lácticos heterofermentantes obligados (BLH) se aíslan de alimentos fermentados tradicionales consumidos por diversas culturas. En investigaciones previas, cepas de *Limosilactobacillus fermentum* (22 y 68), *Levilactobacillus brevis* (61 y 66), *Lentilactobacillus buchneri* (39) y *Weissella confusa* (20) mostraron aptitudes tecnológicas para desarrollar en masas panarias con y sin gluten. En este trabajo se estudiaron aspectos de seguridad (producción de aminos biógenos, AB, y susceptibilidad a antibióticos, ATB) y atributos funcionales (actividad antimicrobiana y habilidad para metabolizar el gluten) de estas cepas para su aplicación como cultivos *starter* de productos panificados. La capacidad de producción de las AB (histamina, cadaverina, putrescina y tiramina) se estudió en medio agarizado conteniendo sus aminoácidos precursores (tirosina, histidina, ornitina y lisina, respectivamente). Se observó producción de AB para las cepas 39 (ornitina), 61 (tirosina, lisina y ornitina) y 66 (ornitina y tirosina). La resistencia a antibióticos (ATB) se evaluó determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante el método de las microdiluciones, según lineamientos de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Ciertas cepas presentaron valores de CIM algo mayores al valor de corte correspondiente a su especie y son necesarios estudios adicionales. Para *Weissella*, EFSA aún no ha definido valores de corte, por lo que estudios sobre ese género cobran importancia adicional. La inhibición de bacterias patógenas/alterantes se realizó mediante el ensayo diferido en *spot*, en dos medios agarizados. En general, la capacidad inhibitoria de las BLH fue mayor en MRS que en SDB (*Sourdough Bacteria Medium*), probablemente como consecuencia de un mejor desarrollo en MRS. *Listeria monocytogenes* fue el patógeno más susceptible y *Weissella confusa* W20 demostró la mayor habilidad inhibitoria frente a todos los patógenos/alterantes ensayados. La naturaleza de los compuestos inhibidores de los BLH se evaluó en sobrenadantes libres de células (SLC) sometidos a diversos tratamientos:

tratamiento térmico (121 °C-15 min), pepsina, proteinasa K y neutralización (pH 7). La inhibición del desarrollo de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y de todas las especies de *Bacillus* (*B. cereus*, *B. subtilis* y *B. licheniformis*) testeadas se conservó con todos los SLC tratados, excepto cuando estos fueron neutralizados. En consecuencia, los compuestos antimicrobianos principales son de naturaleza ácida y, en este caso, serían mayoritariamente los ácidos láctico y acético. Resultados preliminares mostraron para las seis cepas de BLH actividad antifúngica frente a una cepa de *Aspergillus niger*. La actividad antibacteriana y antifúngica observada valoriza a las cepas de BLH como cultivos bioprotectores, sumando a su rol principal de cultivo *starter*. Finalmente, las seis cepas de BLH utilizaron el gluten de trigo presente en un caldo que lo contiene como única fuente de nitrógeno (aumentos entre 0,7 y 2,7 órdenes logarítmicos UFC/ml). Se requieren estudios adicionales para evaluar si esa capacidad sería de utilidad frente a contaminaciones cruzadas con gluten en alimentos libres de TACC. De acuerdo a los resultados obtenidos, la cepa W20 se perfila como candidata segura y con atractivas propiedades funcionales para actuar como cultivo *starter* de productos panificados.

Palabras clave: Bacilos lácticos heterofermentantes, cultivos bioprotectores, resistencia a antibióticos, compuestos antimicrobianos, gluten

1. 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).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar aspectos de seguridad y atributos funcionales de seis cepas de bacilos lácticos heterofermentantes para su aplicación como cultivos *starter* de productos panificados.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas bacterianas, condiciones y medios de cultivo

Seis cepas de BLH, identificadas previamente como *Limosilactobacillus fermentum* (LF22 y LF68), *Levilactobacillus brevis* (LB61 y LB66), *Lentilactobacillus buchneri* (LBu39) y *Weissella confusa* (W20), pertenecientes a la colección de microorganismos del INLAIN, fueron cultivadas de rutina en caldo De Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Biokar, Beauvais, France) y conservadas congeladas a -80 °C en caldo MRS suplementado con glicerol (15% v/v). La temperatura óptima de crecimiento para las cepas de *L. fermentum* fue de 37 °C y para las restantes cepas, de 30 °C. Los recuentos microbiológicos y el control de pureza de las cepas se realizaron en medio MRS agarizado, incubando a la temperatura óptima por 24-48 h.

2.2. 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.

2.3. 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, estreptomicina, 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).

2.4. 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).

2.5. 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).

3. Resultados y discusión

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

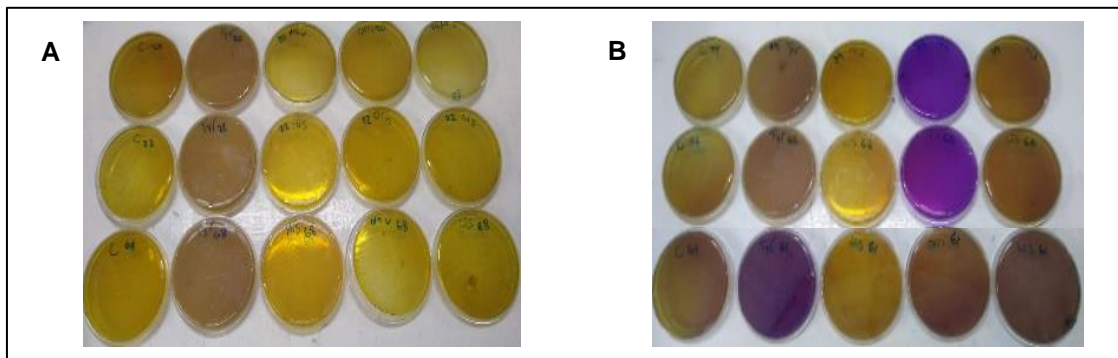


Figura 1. Capacidad de los BLH para producir AB a partir de los aminoácidos precursores (AA: lisina, ornitina, histidina y tirosina, y control negativo, sin AA; de derecha a izquierda). Ausencia (A: cepas W20, LF22 y LF68; de arriba hacia abajo) y presencia (B: cepas LBU39, LB66 y LB61; de arriba hacia abajo) de producción de AB, visualizado por viraje del indicador del amarillo (negativo) al púrpura (positivo).

En general, las cepas de BLH presentaron valores de CIM iguales a o por debajo de los valores de corte de referencia para lactobacilos heterofermentantes obligados, con algunas excepciones en las que resultaron superiores (Tabla 1). Este hecho requiere de la realización de estudios posteriores.

Tabla 1. Valores de CIM ($\mu\text{g/ml}$) para diversos ATB para las cepas de BLH ensayadas.

Cepa		Concentración inhibitoria mínima (CIM, $\mu\text{g/ml}$)							
		VAN	GEN	TET	EST	ERI	AMP	CLF	KAN
<i>Weissella confusa</i>	W20	>256	4	16	32	<0,125	1	4	64
<i>Lentilactobacillus buchneri</i>	LBu39	>256	<1	8	<4	<0,125	1	2	16
<i>Levilactobacillus brevis</i>	LB61	>256	<1	32	32	<0,125	4	8	32
	LB66	>256	<1	16	8	<0,125	1	2	16
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	LF22	>256	<1	32	<4	<0,125	0,5	4	16
	LF68	>256	<1	32	16	<0,125	0,5	4	32

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

Los valores de CIM en negrita indican los casos en los que la CIM > valores de corte de referencia para lactobacilos heterofermentantes obligados (EFSA, Rychen y col., 2018).

La cepa W20 resultó susceptible a kanamicina si se adopta el valor de corte indicado para los lactobacilos heterofermentantes obligados (64 µg/ml), o resistente si se utiliza el valor indicado por EFSA para *Leuconostoc* (16 µg/ml). Suhonen (2019) estudió para *Weissella* la susceptibilidad a antibióticos de 22 cepas pertenecientes a diferentes especies (*W. cibaria*, *W. confusa*, *W. viridescens* y *W. sp.*) con el fin de proponer valores de corte para el género y encontró para kanamicina un valor de 128 µg/ml. Considerando este resultado específico para su género, W20 resulta susceptible al antibiótico en cuestión.

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

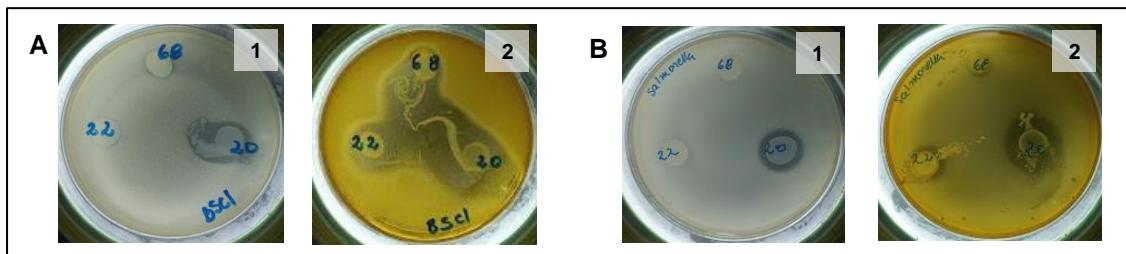


Figura 2. Inhibición de *B. subtilis* (A) y *Salmonella* sp. (B) por LF22, LF68 y W20 en SDB (A1 y B1) y en MRS (A2 y B2) mediante el método de *spot* diferido en medio agarizado.

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

La capacidad antimicrobiana de los SLC de todos los BLH frente a los patógenos/alterantes testados desapareció solo cuando éstos fueron neutralizados, por lo que su poder inhibitorio está relacionado con los componentes ácidos presentes, particularmente ácidos láctico y acético (Figura 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 en los recuentos celulares de entre 0,7 y 2,7 órdenes logarítmicos UFC/ml.

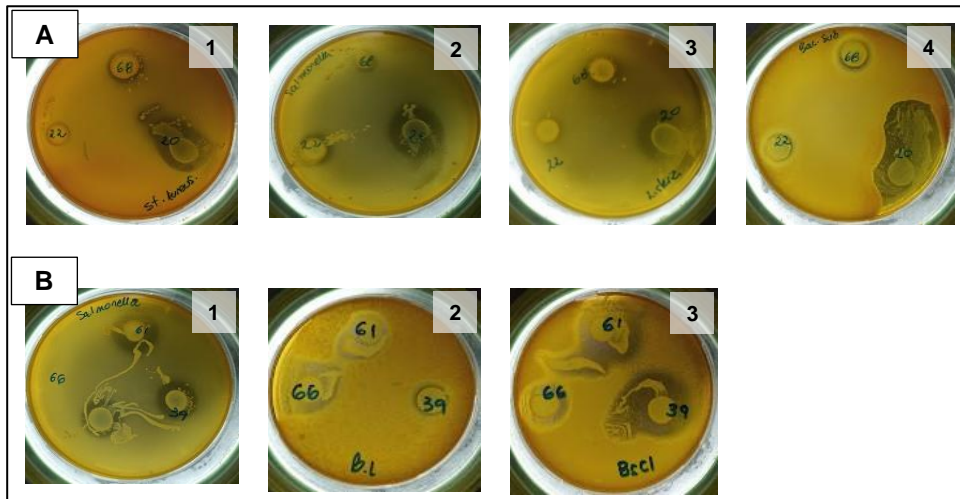


Figura 3. Inhibición de bacterias patógenas/alterantes (A1, *Staphylococcus aureus*; A2 y B1, *Salmonella* sp.; A3, *Listeria monocytogenes*; A4 y B3, *Bacillus subtilis*; B2, *Bacillus licheniformis*) por cepas de BLH (A: W20, LF22, LF68; B: LBU39, LB61, LB66) en agar MRS mediante el método de spot diferido en medio agarizado.

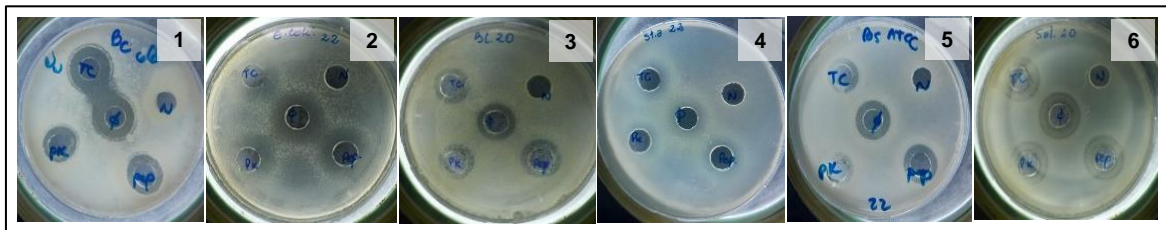


Figura 4. Inhibición de los SLC de LB66 (1), LF22 (2, 4 y 5) y W20 (3 y 6), tratados con: proteinasa K (Pk), pepsina (pep), calentado (\emptyset), neutralizado (N) y sin tratamiento (TC), frente a cepas de patógenos/alterantes (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Salmonella* sp.; de 1 a 6, respectivamente).

4. Conclusiones

La actividad antibacteriana observada valoriza a los BLH como cultivos bioprotectores, sumando a su rol principal de cultivos *starter*. Las cepas de *Limosilactobacillus fermentum* (LF22 y LF68) y de *Weissella confusa* (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.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT; GRF PICT-2018-02935).

6. Referencias

- Arendt, E. K., Moroni, A. y 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.
- Bourdichon, F., Boyaval, P., Casaregola, S., Dupont, J., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Hammes, W. P., Huys, G., Jany, J. L., Laulund, S., Ouwehand, A., Seto, Y., Zgoda, A. y Bech Hansen, E. (2012). The 2012 inventory of microbial species with technological beneficial role in fermented food products. *IDF Bulletin*, N° 455, 21–61.
- Bover-Cid, S. y Holzapfel, W. H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 33–41.
- Cardamone, L., Quiberoni, A., Mercanti, D. J., Fornasari, M. E., Reinheimer, J. A., y Guglielmotti, D. M. (2011). Adventitious dairy *Leuconostoc* strains with interesting technological and biological properties useful for adjunct starters. *Dairy Science & Technology*, 91, 457–470.
- Collins, M. D., Samelis, J. Metaxopoulos, J. y Wallbanks, S. (1993). Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: Description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 595–603.
- 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.
- Gerez, C. L., Rollán, G. C. y de Valdez, G. F. (2006). Gluten breakdown by lactobacilli and pediococci strains isolated from sourdough. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 459–464.
- Klare, I., Konstabel, C., Müller-Bertling, S., Reissbrodt, R., Huys, G., Vancanneyt, M., Swings, J., Goossens, H., y Witte, W. (2005). Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of lactobacilli, pediococci, lactococci and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8982–8986.
- Mogensen, G., Salminen, S., O'Brien, J., Ouwehand, A., Holzapfel, W., Shortt, C., Fonden, R., Miller, G. D., Donohue, D., Playne, M. J., Crittenden, R. G., Biannchi-Salvadori, B., y Zink, R. (2002). *IDF Bulletin*, N° 377, 4–9.
- Quattrini, M., Korcari, D., Ricci, G., y Fortina, M. G. (2019). A polyphasic approach to characterize *Weissella cibaria* and *Weissella confusa* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 128, 500–512.
- Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. L., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., Lopez-Alonso, M., Lopez Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., Villa, R. E., Wallace, R. J., Wester, P., Glandorf, B., Herman, L., Karenlampi, S., Aguilera, J., Anguita, M., Brozzi, R., Galobart, J. 2018. EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed), Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal* 16:5206, 24 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206>
- Suhonen, A. 2019. Antibiotic Susceptibility of Lactic Acid Bacteria Tesis de Maestría University of Helsinki, Master's Programme of Microbiology and Microbial Biotechnology, pág. 44.
<https://helda.helsinki.fi/server/api/core/bitstreams/244c659b-de61-40ec-ab2f-baa965f18160/content>