

N°3 – Año 2014

ISSN 2314-0305



**UNIVERSIDAD
DE SAN PABLO-T**
Tucumán | Argentina

IDITeC

**Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica
para la Competitividad Territorial**

Revista Científica

Universidad de San Pablo-Tucumán

Tucumán, República Argentina

IDITeC. Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica para la Competitividad Territorial. Revista Científica.

Nº3 – Año 2014

Tucumán, República Argentina.

ISSN 2314-0305

Revista de Investigación Científica

Editorial:

EDUSPT. 24 de Septiembre 476.

4000. San Miguel de Tucumán. Tucumán, Argentina.

Contacto: Informes@uspt.edu.ar

www.uspt.edu.ar

Quedan expresamente prohibidas, sin la autorización correspondiente, la reproducción parcial o total de esta obra, por cualquier medio o procedimiento. El contenido de los trabajos, como así también los permisos para reproducción de figuras y tablas, es responsabilidad de los autores.

© Universidad de San Pablo-Tucumán

Queda hecho el depósito que previene la ley
Impreso en Argentina – Printed in Argentina

ISSN 2314-0305

Octubre de 2014

EVALUACIÓN TECNOLÓGICA DE MICROORGANISMOS RELEVANTES PARA LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Technological evaluation of relevant microorganisms for the food industry

Saez, G. D.^{1,2}; Flomenbaum, L.¹; Palacios, J.M.² y Zárate, G.^{1,2}. ¹Universidad de San Pablo-Tucumán, ²CERELA -CONICET, San Miguel de Tucumán, Argentina. gzarate@cerela.org.ar

RESUMEN

Las bacterias lácticas son microorganismos ampliamente utilizados en la industria para la producción y conservación de alimentos debido a su particular metabolismo que confiere al producto interesantes características desde el punto de vista tecnológico: organolépticas (aroma, sabor, textura), nutricionales (síntesis de nutrientes o remoción de compuestos antinutricionales) y de calidad y seguridad del alimento (producción de compuestos antimicrobianos y status GRAS). En este contexto, el objetivo de este trabajo fue aislar cepas de bacterias lácticas a partir de productos fermentados artesanales que se comercializan localmente y evaluar diferentes propiedades tecnológicas a los fines de seleccionar cepas con potencial aplicación en el desarrollo de fermentos que permitan obtener productos de calidad reproducible; nutricional y sensorialmente superiores. A tal fin, muestras de productos lácteos (quesos frescos y madurados), cárnicos (salamines, chorizos criollos, salchichas, queso de chanco) y conservas vegetales (aceitunas, pickles) fueron sembradas en medios de cultivo selectivos para el crecimiento de bacterias lácticas y lactobacilos (MRS y Agar Rogosa respectivamente) e incubadas durante 72 h en condiciones de microaerofilia. Los microorganismos aislados, con características de bacterias lácticas, fueron evaluados en cuanto a su capacidad acidificante (pH y tasa de acidificación en leche), osmotolerancia (crecimiento en presencia de 2; 4; 7 y 10% NaCl), producción de compuestos de aroma (diacético-acetoina en leche), actividad proteolítica (liberación de aminoácidos a partir de la caseína), y actividad lipolítica (hidrólisis de triglicéridos en medio agarizado). De 75 muestras procesadas, se obtuvieron 143 aislamientos, de los cuales se seleccionaron 118 que responden a la características de bacilos Gram (+), catalasa (-), nitrato (-), ac. láctico (+). En cuanto a sus propiedades tecnológicas, se observó una amplia variabilidad entre las cepas pudiendo inferirse algunas relaciones entre propiedad y procedencia, como mayor tolerancia a la sal en aquellos provenientes de encurtidos, alta capacidad acidificante en los provenientes de lácteos y elevada proteólisis en los derivados de productos cárnicos. Los resultados obtenidos representan el paso inicial en el estudio y la selección de microorganismos con potencial transferencia a la industria para su aplicación a la producción de diversos alimentos de acuerdo a las propiedades tecnológicas que cada producto requiera.

Palabras clave: Bacterias lácticas, propiedades tecnológicas, lácteos, cárnicos, vegetales.

SUMMARY

Lactic acid bacteria are microorganisms extensively used by industry for food production and preservation due to their peculiar metabolism that confers the product interesting technological characteristics: organoleptic (such as taste, flavor, texture), nutritional (nutrients synthesis and antinutritional removal) and safety properties (antimicrobials production and GRAS status). In this regard, the objective of the present research was to isolate lactic acid bacteria from artisanal fermented foods and assess their main technological properties in order to select strains that could be potentially used as starters for manufacture of foods with reproducible quality and higher nutritional and sensorial properties. For this purpose, samples from dairy products (fresh and ripened cheeses made with raw milk), sausage meat (salami, chorizo-español) and vegetable foods (pickles and olives) were spread on culture media selective for lactic acid bacteria and lactobacilli (MRS and Rogosa respectively) and incubated during 72 h in microaerophilic conditions. The isolated microorganisms with features of lactic acid bacteria were assessed on their acidifying capacity (pH and acidification rate in milk), osmotolerance (growth in 2, 4, 7 and 10% NaCl), flavor compounds production (diacetyl-acetoina in milk), proteolytic activity (aminoacids released from casein) and lipolytic activity (hydrolysis of triglycerides in agarized medium).

Trabajo subsidiado por la USP-T, para el Proyecto: "Evaluación tecnológica de microorganismos relevantes para la industria alimentaria"

From 75 sampled foods, 143 isolates were obtained and 118 were selected for further characterization since they were bacilli G (+), catalase (-), nitrate (-) and lactic acid (+). With respect to their technological properties a wide variability was observed among strains but some relations between origin and feature could be drawn such as a higher salt tolerance in fermented vegetables, high acidifying ability in dairy strains and high proteolytic activity in microorganisms coming from meat products. The results obtained from this research represent the initial step in the study and the selection of microorganisms that could be potentially transferred to the food industry for production of different foods based on the technological properties required by each product.

Key words: Lactic acid bacteria, technological properties, dairy, meat, vegetables.

INTRODUCCIÓN

Relevancia tecnológica de las bacterias lácticas

Las bacterias lácticas son un conjunto de microorganismos Gram (+), catalasa (-) no esporulantes, en forma de cocos o bastones, bajo porcentaje de G+C en el ADN, generalmente aerotolerantes, y de metabolismo fermentativo, que producen ácido láctico como principal producto metabólico (Cabeza Herrera, 2006; Salminen y von Wright, 1998). Se trata de microorganismos nutricionalmente exigentes, que requieren una variedad de componentes (aminoácidos, péptidos, purinas, pirimidinas y vitaminas tales como vitamina B, ácido pantoténico, biotina y ácido fólico) que no pueden ser sintetizados por ellos, debiendo obtenerlos del medio de crecimiento (Olivera, 2011).

Si bien, estas características nutricionales y metabólicas, condicionan los hábitats naturales propicios para su desarrollo, estos microorganismos pueden encontrarse en alimentos (principalmente lácteos), el intestino y las mucosas de humanos y animales, como así también plantas, suelos y pasturas (Settani y Moschetti 2010). El grupo de las bacterias lácticas está integrado por 12 géneros agrupados en tres categorías metabólicas: homofermentativas obligadas, heterofermentativas obligadas y heterofermentativas facultativas (Axelsson, 2004).

A través de los años, las bacterias lácticas han sido empleadas en la industria de alimentos gracias a sus propiedades metabólicas, ya que estas contribuyen significativamente al sabor, la textura, el valor nutricional y la seguridad microbiana de los productos fermentados (Settani y Corsetti 2008). Entre los géneros comúnmente seleccionados se encuentran *Lactococcus* (lácteos), *Lactobacillus* (lácteos, carnes, cereales y vegetales) *Leuconostoc*

(vegetales y lácteos), *Oneococcus* (vino) y *Streptococcus* (lácteos) (De Vuyst y Tsakalidou, 2008).

El empleo de las bacterias lácticas en la industria, es posible a través de la selección de cultivos iniciadores, o “fermentos”, los cuales están definidos como “cultivos puros o mezclas de microorganismos que se inoculan en los productos alimenticios con el objetivo de reemplazar a la microbiota endógena de la materia prima para mejorar los procesos de fermentación, contribuir a las propiedades organolépticas del producto a través de compuestos generadores de sabor, aroma o textura; y además, obtener productos más estables y homogéneos con calidad sanitaria asegurada” (García Ibarra, 2007; Olivera, 2011).

Entre los criterios de selección de cepas como potenciales cultivos iniciadores se pueden destacar los siguientes:

- *Capacidad acidificante:* Se pueden considerar adecuadas para su inclusión en cultivos iniciadores aquellas cepas que produzcan un descenso rápido de pH durante las primeras horas de incubación, ya que así se asegura una correcta acidificación de la materia prima, favoreciendo a procesos como el desuerado del queso y evitando la proliferación de la microbiota indeseable. (Quiberoni y col, 1998)

- *Osmotolerancia* (tolerancia a la sal), variando en este caso las exigencias en función del producto a elaborar.

- *Capacidad de superar a la microbiota endógena:* debido a la competencia por nutrientes y a la producción de metabolitos (ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas) que inhiben el desarrollo de bacterias alterantes y patógenas. (Rinne y col, 2005; Messens y De Vuyst, 2002)

- *Actividad proteolítica:* La proteólisis es un proceso de degradación proteica debido a enzimas presentes en los alimentos, así como también por microorganismos endógenos que

poseen enzimas capaces de hidrolizar las proteínas. Esto se debe, a que las bacterias lácticas utilizan una proteinasa que se encuentra asociada a la pared celular, la cual genera oligopeptidos como producto de la degradación que luego son internalizados mediante sistemas de transportes de oligopeptidos y permeasas y una vez en el interior de la célula son degradados por peptidasas intracelulares, dando como producto aminoácidos y péptidos pequeños. En el caso de los derivados lácteos, por ejemplo quesos, la degradación proteica es un fenómeno deseado, debido a que interviene en los perfiles de sabor, aroma y textura que son obtenidos (Savijoki y col, 2006).

- *Actividad lipolítica:* La lipólisis es un fenómeno bioquímico que consiste en la liberación de ácidos grasos y glicéridos parciales a partir de la grasa contenida en la materia prima, estos compuestos son importantes en el desarrollo del sabor y del aroma, así como en la textura de productos como el queso (McSweeney y Sousa, 2000).

- *Estabilidad de las propiedades deseables durante el procesamiento y el almacenamiento.*

- *Inocuidad de las cepas,* ya que en todos los casos debe tratarse de microorganismos considerados GRAS (Generally Recognized As Safe). Dentro de este apartado es importante verificar que no presenten resistencia transferible a los antibióticos, ya que podrían entonces convertirse en potenciales reservorios para la transmisión de estas resistencias a través de la cadena alimentaria.

Aplicaciones en la industria alimentaria

La incorporación de bacterias lácticas en el proceso de producción y conservación de alimentos, es un procedimiento que han utilizado las distintas civilizaciones a través de la historia. Actualmente, estos microorganismos se emplean en la manufactura de diversos alimentos como lácteos (yogurt, quesos, kéfir), embutidos cárnicos (salames, chorizo español) y alimentos de origen vegetal (encurtidos, chucrut y aceitunas). Como se mencionó, la industria alimentaria manifiesta gran interés por su empleo por cuanto su particular metabolismo, confiere al producto características relevantes desde el punto de vista tecnológico: organolépticas, nutricionales, de calidad y seguridad del alimento.

La inoculación de la leche con cultivos iniciadores de bacterias lácticas seleccionadas permite la obtención de productos lácteos fermentados con unas características organolépticas óptimas. Asimismo, la inoculación de cepas seleccionadas de un modo

controlado y dirigido permite la reproducibilidad del proceso de producción. De este modo, la selección de las distintas especies y cepas microbianas es decisiva a la hora de obtener productos con las mejores propiedades organolépticas y nutricionales.

Las aplicaciones más importantes de las bacterias lácticas como cultivos iniciadores en la industria láctea han sido la obtención de yogurt y diversos quesos madurados, pero también se utilizan para la producción de leches acidófilas, mantecas, kéfir, entre otros. Las principales especies de bacterias lácticas utilizadas en la producción de productos lácteos fermentados son: *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*, responsables de la producción del yogurt; *Lactococcus lactis* spp. *lactis* y *L. lactis* spp. *cremoris*, que participan en la producción de quesos madurados; y *L. lactis* spp. *cremoris* y *L. lactis* spp. *diacetylactis*, que participan en la producción de mantequilla acidificada. (Tojo Sierra y col 2006).

La BAL como cultivos iniciadores en la industria cárnica son empleados principalmente con fines tecnológicos, ya que originan cambios organolépticos deseables en los embutidos durante el proceso de maduración (descenso rápido del pH de la carne, desecación y concentración de la sal, generación de productos volátiles aromáticos), y producen sustancias antimicrobianas que contribuyen a la reducción y posterior desaparición de bacterias Gram (-) (principalmente *Pseudomonas* y *Enterobacteriaceae*) (Larpen 1995). Las especies de BAL más empleadas en la industria cárnica pertenecen a los géneros *Lactobacillus* (*Lb. sakei* y *Lb. curvatus*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, y ocasionalmente *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. paracasei*) y *Pediococcus* (*P. cerevisiae*, *P. pentosaceus*, *P. acidilactis*). (Cabeza Herrera 2006).

La fermentación láctica de los vegetales es un proceso microbiano complejo que conduce al dominio de la flora láctica, la cual es poco importante en la microflora inicial. Las bacterias lácticas eliminan por una parte a los microorganismos responsables de la alteración (principalmente bacterias G(-) y bacterias esporuladas) producto de la acidificación, y por otro lado a sus enzimas pectinolíticas responsables de las putrefacciones blandas. Las bacterias lácticas que predominan en la fase de iniciación y la fermentación primaria incluyen *Streptococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum*. Las dos primeras especies no soportan bien la sal, ni la

acidificación, y tienen poca importancia en salmueras con más de un 5% de NaCl. *Lactobacillus plantarum* es el más ácido-tolerante, y es el que finaliza la mayor parte de las fermentaciones en los vegetales. Por otro lado *Pediococcus rhamnosus* y *Pediococcus cerevisiae* también suelen estar implicados en la fermentación de los vegetales. (Cabeza Herrera, 2006).

Ahora bien, la incorporación de las bacterias lácticas en la producción de los alimentos mencionados, requiere la evaluación previa de las propiedades tecnológicas relevantes para cada producto al cual pretenden aplicarse a fin de seleccionar las cepas que formarán parte del "cultivo iniciador" del mismo. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue aislar cepas de bacterias lácticas a partir de productos fermentados artesanales (encurtidos, embutidos, quesos y quesillos elaborados con leche sin pasteurizar) y evaluar sus principales propiedades tecnológicas con el fin de considerarlas como potenciales microorganismos iniciadores en la industria alimentaria. A tal fin, se determinó: capacidad acidificante, osmotolerancia, y actividades enzimáticas proteolíticas y lipolíticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de bacterias lácticas de alimentos fermentados de manufactura artesanal

El aislamiento de cepas de bacterias lácticas se realizó a partir de productos fermentados artesanales (encurtidos, embutidos, y quesos elaborados con leche sin pasteurizar). Muestras de cada alimento fueron homogeneizadas en solución fisiológica (NaCl 0,9%) y diluidas en forma decimal y sembradas en profundidad en medios agarizados selectivos (MRS agar para bacterias lácticas, Rogosa agar para lactobacilos) e incubadas 72 hs en microaerofilia. Las colonias seleccionadas por su diferente morfología y textura fueron transferidas a medio líquido (Laptg caldo, Raubaud y col 1961) para su posterior identificación, la cual se llevó a cabo en forma preliminar en base a sus características fenotípicas (pruebas fisiológicas y bioquímicas) de acuerdo al Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, 8va edición.

Evaluación de sus propiedades tecnológicas relevantes para la industria

Se determinaron las siguientes propiedades consideradas relevantes para la formulación de cultivos iniciadores:

-*Capacidad acidificante:* Se evaluó, pH final, acidez titulable, y tasa de acidificación en leche. Para ello, los microorganismos fueron cultivados en caldo MRS (DeMan, Rogosa and Sharpe, 1962) hasta fase exponencial y estandarizados a igual DO₅₆₀ para su inoculación al 1% en leche descremada reconstituida al 10% (LDR) con posterior incubación a 30°C. La capacidad acidificante se determinó por medidas de pH a intervalos (Metrohm Phmetro 692 Herisau, Switzerland).

-*Osmotolerancia:* Se evaluó crecimiento de los microorganismos en presencia de concentraciones crecientes de NaCl. Para ello se determinó por absorbancia, la biomasa final alcanzada en Laptg (Raubaud y col 1961) con 0%, 2%, 4%, 7% y 10% de NaCl.

-*Producción de diacetilo-acetoína:* La producción de estos compuestos se determinó luego de su incubación en LDR a 37 °C durante 24 h. Para ello, se tomó 1 mL de leche coagulada, se agregó 0,5 mL de 0,5% α -naftol y 0,2 mL de KOH-creatina (0,3 g de creatina en 40% KOH). Se mezcló 15 segundos, dejando reposar 1 minuto. Se mezcló nuevamente y se dejó reposar por 5 minutos hasta la aparición de color.

- *Determinación de actividad proteolítica:* La cuantificación de la actividad proteolítica de los aislados se realizó por el método espectrofotométrico de Church y col. (1983) que se basa en la reacción del *o*-phthaldialdehído (*o*PA) y el β -mercaptoetanol con los grupos amino de los aminoácidos, formando un complejo que absorbe fuertemente a 340 nm. Las cepas fueron inoculadas al 1% en LDR e incubadas a 30°C durante 24 hs. Alicuotas fueron desproteinizadas con ácido tricloroacético (TCA) (1:2) y los sobrenadantes fueron incubados con la solución de *o*PA (50mL tetraborato de sodio 100mM; 5 mL dodecilsulfato sódico 20%; 2mL *o*Pa 40mg/mL disuelto en metanol, 0,2mL β -Mercaptoetanol) determinándose la absorbancia a 340 nm en espectrofotómetro.

- *Determinación de actividad lipolítica:* La capacidad lipolítica de las cepas se evaluó en un medio de cultivo enriquecidos en materia grasa: Agar Tributirina según el método propuesto por Medina y col. (2004). Se prepararon placas conteniendo 20 mL de medio (agar-agar 1,50% (p/v), triglicérido 0,25% (v/v), azida sódica 0,02% (v/v) y 100 mM de buffer fosfato de sodio pH 7,00). Una vez solidificado el medio, se realizaron pocillos de 1 cm de diámetro, donde se sembraron 100 μ L de las muestras correspondientes (suspensiones celulares) y se incubaron 48 h a 37°C. La actividad fue detectada por aparición de halos claros alrededor de los pocillos. Se utilizó una solución

de lipasa pancreática porcina (1 mg/mL) diluida 1/10 como control positivo y una solución de buffer fosfato estéril, como control negativo.

RESULTADOS

A partir de 74 muestras de alimentos fermentados se obtuvieron 143 aislamientos de los cuales 118 fueron identificados como

lactobacilos por sus características fenotípicas: bacilos Gram (+), catalasa (-), nitrato (-), ac. láctico (+), Figura 1.

El 29% (34 cepas) de los lactobacilos aislados provino de alimentos de naturaleza láctea, el 46% (54 cepas) fue aislado de embutidos cárnicos y el 25% restante (30 cepas) de alimentos vegetales (Gráfico 2).

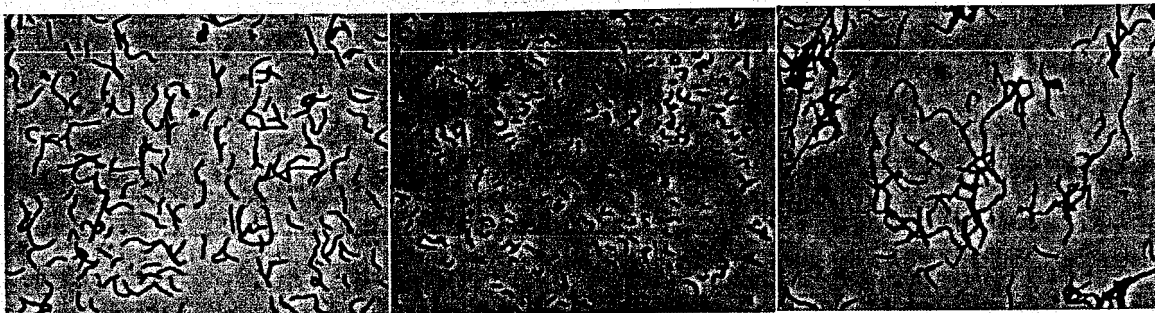


Figura 1: Diferentes morfologías de lactobacilos aislados en este estudio.

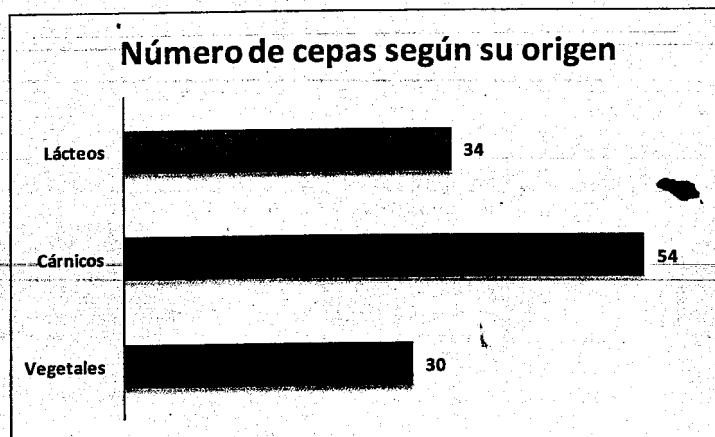


Gráfico 2: Distribución de los aislamientos según su procedencia.

Con respecto a las principales características tecnológicas, las propiedades acidificantes de los microorganismos se presentan en la tabla 1.

Las cepas de origen lácteo mostraron las mejores propiedades acidificantes con una elevada proporción de cepas capaces de coagular la leche entre 12 y 36 hs, de disminuir el pH por debajo de 5, elevada acidez Dornic y tasas de acidificación media y alta. En el caso de las cepas cárnicas el 53% de los microorganismos coagularon la leche entre las 12 y 36 hs alcanzando un pH final inferior a 5. Sin embargo, la mayoría de las cepas (94%) mostraron tasas de acidificación baja y media. Por último, las cepas vegetales, se distribuyeron equitativamente entre cepas que coagulan la leche entre 12 y 36 h (50%) y otras incapaces de hacerlo (50%). En concordancia con esto más del 50 % de los aislamientos mostraron tasas

bajas de acidificación. Sin embargo, el porcentaje de cepas con alta tasa de acidificación fue similar al ambiente lácteo y muy superior a la proporción de cepas que tienen esta propiedad en medio cárnico (tabla 1).

Una propiedad relevante para el desarrollo del sabor es la producción de diacétilo-acetoína. En el Gráfico 3 se observa la distribución de los aislamientos en base a su capacidad de producción de estos compuestos. Una distribución similar y equitativa se observó en el rango de producción entre las cepas provenientes de productos lácteos y cárnicos. Por el contrario, la mayor parte de los aislamientos de vegetales se distribuyeron entre cepas no productoras y aquellas de producción intermedia con bajos porcentajes de cepas de producción intensa y débil.

Tabla 1: Capacidad acidificante de los microorganismos provenientes de diferentes ecosistemas

Propiedades	ORIGEN		
	Cárnico	Lácteo	Vegetal
Coagulación de la leche			
< 12 h	0%	0%	0%
12 a 36 h	53%	64%	50%
Sin coagulación hasta 36 h	47%	36%	50%
pH final¹			
> a 6	23,5%	15,7%	50%
5,1 a 6,0	23,5%	21%	12,5%
< a 5,0	52,9%	63%	37,5%
Tasa de acidificación²			
Baja (0 – 0,04)	47%	26,3%	57%
Media (0,04-0,08)	47%	42,1%	14%
Alta (> 0,08)	6%	31,6%	29%

¹pH final de la leche determinado a las 36 horas.

²Tasa de acidificación: ΔpH/minutos, ΔpH = pHinicial - pHfinal.

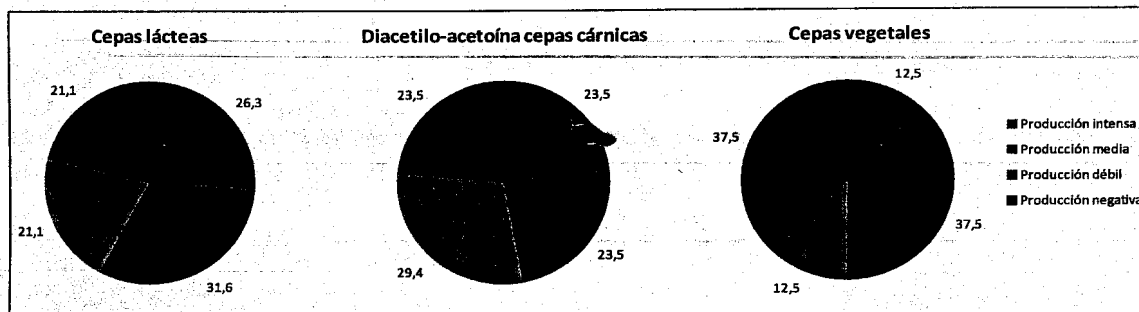


Gráfico 3: Porcentajes de aislamientos que producen diacetilo-acetoína en forma intensa, media o débil.

Otra propiedad relacionada con el desarrollo del sabor de los productos fermentados es la actividad proteolítica que da lugar a la liberación de péptidos y aminoácidos en el medio. En el Gráfico 4 se muestra la distribución de los aislamientos de cada origen en base a su capacidad para liberar aminoácidos a partir de la caseína. Un elevado porcentaje de

cepas de los tres ambientes analizados (60-70%) mostraron actividad proteolítica intermedia y solo el 10 al 20 % de los microorganismos lácteos o cárnicos mostraron elevada capacidad para liberar aminoácidos. Ninguna de las cepas ensayadas en este estudio mostró significativa actividad lipolítica (datos no mostrados).

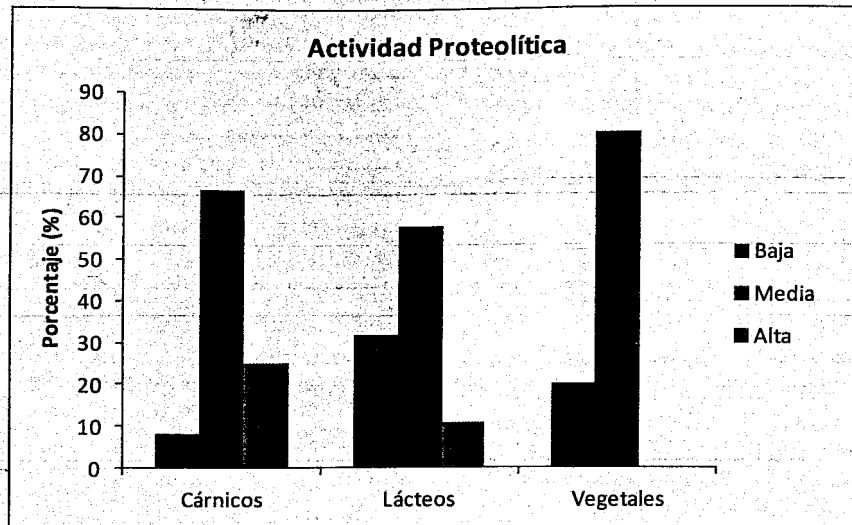


Gráfico 4. Distribución de los aislamientos en base a su actividad proteolítica

Finalmente, se evaluó la osmotolerancia de los microorganismos por cuanto los alimentos de los que provienen y en los que se pretende volver a incorporar los suelen tener una elevada concentración de NaCl que es adicionado durante la manufactura de los mismos. En el Gráfico 5 se presenta el crecimiento de los microorganismos de diferente origen en presencia de concentraciones crecientes de NaCl. En presencia de 2% NaCl todas las cepas fueron capaces de alcanzar más del 60% de la biomasa alcanzada en ausencia de

esta sal. Con concentraciones intermedias (4%) las cepas cárnicas y vegetales mostraron mayor tolerancia que las lácteas y alcanzaron más del 45% de desarrollo de los cultivos control. En la mayor concentración de sal evaluada (10%), las cepas vegetales mostraron un desempeño ligeramente superior, alcanzando biomasa cercanas al 27% del valor control mientras que las cepas lácteas promediaron un valor de 17% de biomasa relativa al control desarrollado en ausencia de NaCl.

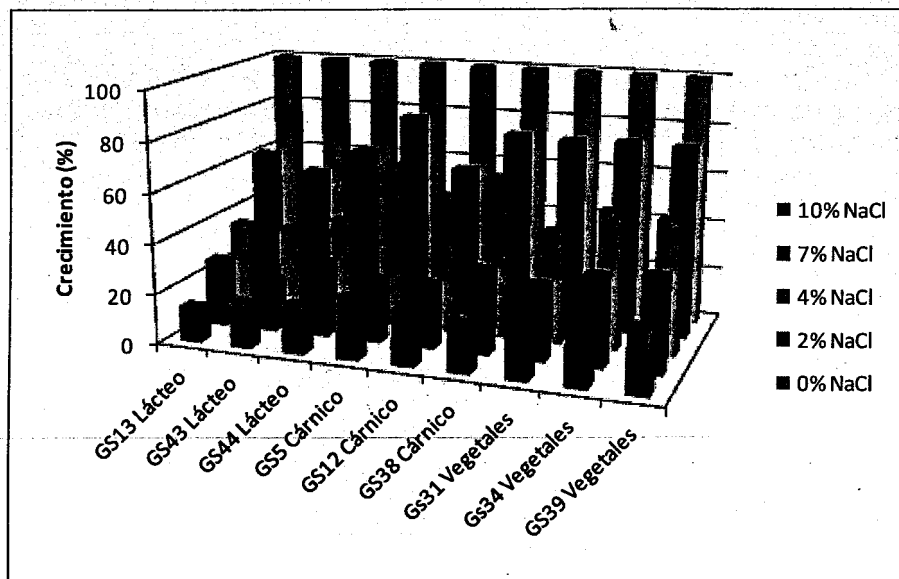


Gráfico 5: Crecimiento de microorganismos de diferente origen en presencia de concentraciones crecientes de NaCl. Las barras muestran porcentajes relativos al desarrollo en ausencia de sal (valor considerado como control o 100%). Se muestran las 3 cepas más representativas de cada ambiente.

DISCUSIÓN

Las bacterias lácticas han sido utilizadas a lo largo de los años por la industria alimentaria

como microorganismos fermentadores con el objetivo de obtener productos con mayor tiempo de conservación y conferir algunas características organolépticas a los alimentos

como sabor y aroma. En las últimas décadas, se ha profundizado el estudio del metabolismo y las actividades enzimáticas de estos microorganismos para caracterizar diversas propiedades adicionales que puedan impactar tanto tecnológica como nutricionalmente en el producto, ofreciendo a los consumidores mayor variedad, calidad y seguridad.

Teniendo en cuenta el gran atractivo que representa para la industria la inclusión de microorganismos que reúnan estas características para la formulación controlada de alimentos, en este trabajo se aislaron a partir de diferentes tipos de productos artesanales fermentados, cepas consideradas no pertenecientes al cultivo iniciador del alimento (cepas silvestres o no starter). Dado que se conoce que uno de los géneros más representativos de esta población es *Lactobacillus* (Demarigny y col 1996; Settanni y Moschetti, 2010), se decidió seleccionar a los aislamientos que respondieron a la característica de este género: Bacilos Gram (+), Catalasa (-), Nitrato reductasa (-).

Un paso clave para el diseño de fermentos o cultivos adjuntos es la evaluación de las potencialidades que cada cepa o conjunto de las mismas puedan ofrecer. Para ello es necesario evaluar diferentes características, como perfiles de fermentación de azúcares, producción de ácidos y compuestos volátiles, actividades proteolíticas y lipolíticas, síntesis de oligosacáridos, entre otras.

En este contexto se caracterizaron algunas de estas propiedades tecnológicas en las cepas de lactobacilos aisladas. En primer lugar se evaluó la capacidad acidificante de las mismas, ya que el rápido establecimiento de un medio ácido conferirá propiedades similares a este tipo de productos (lácteos, cárnicos y vegetales) como la protección contra la proliferación de microorganismos indeseables (bacterias gram negativas y bacterias esporuladas) o la inactivación de enzimas responsables de alteraciones, asegurando la predominancia del cultivo iniciador y la utilización de compuestos propios de las matrices alimentarias para la síntesis de metabolitos adecuados a las cualidades del producto final. En este trabajo, se observó variabilidad en la capacidad acidificante de las cepas aisladas, lo que coincide con lo informado por otros autores y es considerado como una propiedad dependiente de cepa (Guern, 1995; Medina y col. 2001; Beldarraín y col. 2008). Sin embargo, esta capacidad está acentuada en el ambiente lácteo por cuanto un elevado

porcentaje de cepas mostraron tasas de acidificación media y elevada (42,1 y 31,6 respectivamente) en contraposición a lo observado en el ambiente cárnico y vegetal. La capacidad de coagulación de la leche como así también la tasa de acidificación (es decir, la capacidad de acidificar el medio en relación al tiempo en que se produce esa acidificación) se consideran criterios de selección muy importantes para cultivos lácteos iniciadores (Casalta y col, 1995) siendo en definitiva, este último factor el que asegurará que leches fermentadas y quesos tengan un rápido descenso de pH (para evitar contaminaciones tempranas) y una adecuada degradación enzimática de la caseína.

Por otra parte la producción de diacetil-acetoina es considerada también una propiedad tecnológica deseable para la selección de cepas iniciadoras. La producción de estos compuestos se fundamenta en el catabolismo del citrato por bacterias lácticas, que lleva a la formación de piruvato y CO₂ (Fleming y col. 1985). El piruvato es el punto de partida de nuevas rutas metabólicas, que conducen a la formación de acetaldehído, acetoina y diacetil. Entre los resultados observados se puede destacar la producción de diacetil-acetoina en un amplio número de cepas, mayoritariamente en productos lácteos y cárnicos, y en menor medida en vegetales. La producción de estos compuestos por cepas de bacterias lácticas fue señalada en diferentes alimentos: lácteos, a los cuales confiere el típico aroma a manteca (Nieto Arribas, 2010); embutidos cárnicos ya que el citrato es uno de los conservantes utilizado con mayor frecuencia en estos productos (Magni y col. 2009); vinos, donde dicarbonilos interactúan con el azufre de aminoácidos, produciendo un espectro variable de flavors (Araque Granados, 2010) y también se observó la producción de estos compuestos en encurtidos como el chucrut en los que ayudan a lograr su sabor característico. (Alvarado y Cabrera, 2010).

La actividad proteolítica de los microorganismos es clave para el crecimiento de los mismos en matrices alimentarias como la leche e igualmente importante para el desarrollo del sabor en los productos fermentados. Así, solo las cepas con capacidad para degradar la caseína desarrollarán en leche o contribuirán al desarrollo del sabor de los quesos durante la maduración, mediante la liberación de péptidos o aminoácidos como por ejemplo prolina y leucina que confieren sabores picantes a quesos tipo suizo. De igual manera la proteólisis de las proteínas de la carne durante la maduración de

los embutidos fermentados conferida al producto su sabor característico. En el presente estudio la mayoría de las cepas provenientes de los tres ambientes examinados mostraron moderada actividad proteolítica y solo el 10 al 20 % de los microorganismos lácteos o cárnicos mostraron elevada capacidad para liberar aminoácidos. Estudios realizados por otros autores (Herreros y col. 2003; González y col. 2010) informaron resultados similares en cuanto a las actividades proteolíticas de lactobacilos provenientes de estos ambientes.

La tolerancia a la sal es una propiedad importante en los tres grupos de alimentos evaluados en este trabajo por cuanto todos incorporan NaCl en diferentes concentraciones durante el proceso de elaboración con el objetivo de evitar el desarrollo de microorganismos perjudiciales, contribuir al desuerado de la cuajada (en el caso de los quesos), formar cortezas y potenciar sabores. Sin embargo, solo los encurtidos permanecen expuestos a soluciones salinas durante toda su vida de estante por lo que la capacidad de desarrollar y permanecer viables en este ecosistema es altamente deseable. En este sentido los aislamientos provenientes de vegetales fermentados mostraron mejor desarrollo en presencia de concentraciones crecientes de sal (hasta 10%) que las cepas cárnicas y lácteas. Estos resultados se diferencian de los obtenidos por Pundir y col, (2013) en el cual cepas aisladas de origen vegetal desarrollan hasta una concentración de NaCl del 6,5%, mientras que Hoque y col, (2010), reportan en cepas aisladas de productos lácteos, tolerancia del 9% de concentración de NaCl, en ambos casos una tolerancia menor a la obtenida en este estudio.

En conclusión, las cepas aisladas e identificadas en este trabajo como bacterias lácticas del género *Lactobacillus*, mostraron características tecnológicas importantes que podrían hacerlas adecuadas para ser incluidas en fermentos lácticos. Cepas con diferentes propiedades, tales como elevada tasa de acidificación, liberación de compuestos de aroma como diacetilo-acetofina, elevada actividad proteolítica y osmotolerancia, fueron seleccionadas para ensayos posteriores. Los resultados hasta aquí obtenidos representan el paso inicial en el estudio y la selección de microorganismos con potencial transferencia a la industria para su aplicación a la producción de diversos alimentos de acuerdo a las propiedades tecnológicas que cada producto requiera.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo fue realizado en el marco del Proyecto IC400, convocatoria 2013 del Instituto de Competitividad de la USP-T.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, J. M. y Cabrera, V. L. (2010). Determinación del tiempo de vida útil en los pimientos california verdes fresco en bandejas plásticas empacados con papel film. Seminario de graduación. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador.
- Araque Granados, M.I. (2010). Estudio bioquímico y molecular de la producción de precursores de carbamato de etilo por bacterias lácticas asociadas al proceso de vinificación. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili, España.
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. En: Lactic acid bacteria. Microbiological and functional. Salmien, S. von Wright, A. y Ouwehand, A. (Eds.). *Marcel Dekker, Inc.* New York, EEUU.
- Beldarraín, T., Cepero, Y., Bruselas, A., Santos, R., Ramos, M., Moya, Y., Núñez, M. y Vergara, N. (2008a). Caracterización de cultivos iniciadores en productos cárnicos. Parte 1. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 18(2), 8-15.
- Cabeza Herrera, E. A. (2006). Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estándar para la industria láctea y cárnica. Conferencia dada en el: Simposio Regional de Microbiología "Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo", Universidad Libre, Barranquilla.
- Casalta, E., Vassal, Y., Desmazeaud, M.J. and Casablanca, F. (1995). Comparaison de l'activité acidifiante de souches de *Lactococcus lactis* isolées de latí de corse. *Lebensmittel-Wissenschaft un Technologie*, 28, 291-299.
- Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H. and Catignani, G.L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*. 66, 1219-1227.
- Demarigny, Y., Beuvier E., Dasen, A. and Duboz, G. (1996). Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. 1. Evolution of microflora during ripening and characterization of facultatively heterofermentative lactobacilli. *Lait*. 76, 371-387
- De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23, 130-155.
- De Vuyst, L., and Tsakalidou, E. (2008). *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional

and promising species for dairy fermentations. *International Dairy Journal*. 18, 476-485.

Fleming, H.P., McFeeters, R.F. and Daeschel, M.A. (1985). The lactobacilli, pediococci and leuconostocs: vegetable products. En: *Bacterial Starter Cultures for Foods*. Gilliland, S.E. (Ed.), *CRC Press*, Florida.

García Ibarra, J.A. (2007). Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

González, L. Sacristán, N., Arenas, R., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E. (2010). Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. *Food Microbiology*, 27, 592-597.

Guern, J.L. (1995). Los vegetales fermentados. En: *ICMSF, Microbiología Alimentaria Vol. 2., Las fermentaciones alimentarias*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

Herreros, M. A., Fresno, J. M., González Prieto, M. J., and Tornadijo, M. E. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *International of Dairy Journal*, 13, 469-479.

Hoque, M.Z., Akter, F., Hossain, K.M., Rahman, M S.M., Billah, M M. and Islam, K.M.D. (2010). Isolation, identification and analysis of Probiotic properties of *Lactobacillus* Spp. from selective regional yoghurts. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 5(1), 39-46.

Magni, C., García-Quintáns, N., Martín, M., De Mendoza, D. y López, P. (2009). Sistemas de utilización del citrato en bacterias ácido lácticas. En: *Fundamentos biológicos, procesos y biotecnología de Bacterias lácticas*. Ed. Pérez Martínez, G. *CSIC*, España

McSweeney, P. L. H. and Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening. *Le Lait*. 80, 293-324.

Medina, R., Katz, M., González, S. and Oliver, G. (2001). Characterization of the Lactic Acid Bacteria in Ewe's Milk and Cheese from Northwest Argentina. *Journal of Food Protection*, 64(4), 559-563.

Messens, W. and De Vuyst, L. (2002). Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 72, 31-43.

Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A. and Lodi, R. (2006).

Technological characterisation of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. *International Dairy Journal*. 16, 867-875.

Nieto Arribas, P.D. (2010). Diversidad genética y caracterización tecnológica de cepas autóctonas aisladas de queso de D.O. "manchego", para su selección como cultivo iniciador. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha, España.

Pundir, R.K., Rana, S., Kashyap, N. and Kaur, A. (2013). Probiotic Potential of Lactic acid Bacteria Isolated from food Samples – an in Vitro study. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(3), 085-093.

Quiberoni, A., Tailliez, P., Quéneé P., Suárez, V. and Reinheimer, J. (1998). Genetic (RAPD-PCR) and technological diversities among wild *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Applied Microbiology*. 85, 591-596.

Raibaud, P., Caulet, M., Galpin, J.V. and Mocquot, G. (1961). Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs II. Streptococci: selective enumeration and differentiation of the dominant group. *Journal of Applied Bacteriology*, 24, 285-291.

Rinne M., Kalliomaki M., Arvilommi H., Salminen S. and Isolauri E. (2005). Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *Journal of Pediatrics*. 147, 186-191.

Salmien, S. and von Wright, A. (1998). Lactic Acid Bacteria microbiology and functional aspects. 2nd edition. New York, EEUU. *Marcel Dekker Inc.*

Savijoki, K., Igmer, H. and Varmanen P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71, 394-406.

Settanni, L. and Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 121, 123-138.

Settanni, L. and Moschetti, G. (2010) Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*. 27, 691-697.

Tojo Sierra, R., Leis Trabazo, R., Barros Velázquez, J. and Prado Rodríguez, M. (2006). Productos lácteos fermentados. *Anales de pediatría*. 4, 54-66.

Olivera, J. (2011). Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas de aisladas de la leche. Tesis de Licenciatura. Unidad de Tecnología de Alimentos – Facultad de Agronomía – Universidad de la República, Uruguay.