

27. Agroalimentos

Fermento láctico para mejorar panes sin gluten. Selección del medio de cultivo para producir biomasa.

Paulon Florencia¹; Dr. Capra, M. Lujan ²

¹ autor; ² orientador

paulonflor@gmail.com; mcapra@fbc.unl.edu.ar;

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas / Instituto de Lactología Industrial (INLAIN)

Universidad Nacional del Litoral

Resumen

Los productos libres de gluten no se encuentran ampliamente disponibles, son costosos, menos palatables y nutricionalmente más pobres que el pan de trigo tradicional. El reemplazo de gluten en productos panificados es un desafío ya que el mismo proporciona las propiedades viscoelásticas a la masa y su ausencia genera panes con baja calidad tecnológica.

Algunas especies de bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en la fermentación de la masa para elaborar pan otorgan influencias positivas en la calidad del producto: textura, aroma, propiedades nutricionales y vida útil del pan. Una cepa heterofermentante de BAL, *Weissella cibaria* 20, demostró como fermento aptitud para el mejoramiento sensorial y estructural de pan sin gluten en investigaciones previas. En este trabajo se buscó propagar esa cepa en un medio económico y libre de TACC, comparando la productividad del medio formulado con la del medio de cultivo comercial de elección para el crecimiento de BAL en laboratorio. Para ello se probaron distintas alternativas: medio en base a suero de quesería, medio en base a permeado de suero de quesería (PSQ), medio *Sour Dough Bacteria* e hidrolizados obtenidos a partir de harinas de sorgo y de trigo sarraceno. Los resultados obtenidos indican que el medio PSQ (subproducto lácteo) suplementado con glucosa mostró una elevada producción de biomasa en corto tiempo; presentando dos ventajas: la utilización 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.

Palabras claves: pan sin gluten, biomasa, fermento láctico, suero de quesería

Introducción

La celiacía es una enfermedad hereditaria y autoinmune que puede dispararse en individuos genéticamente susceptibles por ingesta de gluten presente en trigo, avena, cebada y centeno (TACC). En Argentina, se estima que 1 de cada 100 personas es celíaca (Ministerio de salud, 2014). El único tratamiento médico disponible y seguro es una dieta libre de gluten de por vida. El reemplazo de gluten en productos panificados es un desafío para el tecnólogo de cereales, dado que el mismo proporciona las propiedades viscoelásticas a la masa y su ausencia genera panes con baja calidad tecnológica. Los productos libres de gluten no se encuentran ampliamente disponibles, son costosos, menos palatables y nutricionalmente más pobres que el pan de trigo tradicional (Arendt, Moroni y Zannini, 2011).

Algunas especies de bacterias lácticas heterofermentantes suelen integrar la microbiota de "masas madres", ecosistemas microbiológicos complejos e indefinidos utilizados tradicionalmente para elaboración de panificados artesanales. Tales consorcios microbianos otorgan influencias positivas en varios aspectos de la calidad del producto: textura, aroma, propiedades nutricionales y período de conservación o vida útil del pan (Guerzoni, Gianotti y Serrazanetti,

2011). La cepa *Weissella cibaria* 20, perteneciente a una de las especies presentes en masas madres, 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 (Peveengo, 2018). El uso de esta cepa podría resultar en 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. En este sentido y favorecido por la creciente conciencia ecológica sobre la importancia de la reducción de la contaminación industrial, se ha estimulado el uso de ciertos efluentes como medios de cultivo "no tradicionales", contribuyendo a la disminución de los costos industriales

derivados de la decontaminación de los mismos. 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.

En este trabajo se investigó el desarrollo de *W. cibaria* 20 en diferentes medios de bajo costo y libres de gluten para optimizar la producción de biomasa, con vistas a un posterior desarrollo del fermento a escala industrial.

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.

Materiales y métodos

Cepa, condiciones y medios de cultivo

Para este trabajo se empleó la cepa *Weissella cibaria* 20 (W20) perteneciente al Cepario del INLAIN e identificada genéticamente en un trabajo previo (por secuenciación de un fragmento de ADN

correspondiente al gen del ARN 16S). La cepa se reactivó en caldo MRS (Biokar, Beauvais, Francia) a temperatura óptima ($T_{\text{ópt}}$) de 30 °C por 24-48 h, a partir de un cultivo puro congelado. Partiendo del reactivado se realizó una suspensión *stock* (suspensión celular de almacenamiento a temperatura de refrigeración) en caldo MRS y se incubó a $T_{\text{ópt}}$ durante 16-18 h (overnight, o.n). Comenzando por esta suspensión celular se renovó el *stock* cada 15 días. Para usarla rutinariamente en los distintos ensayos, se realizaron al menos dos o.n. sucesivos de la cepa.

Medios de cultivo para producir biomasa

a) Medio en base a suero de quesería, SQ. El medio se formuló según lo indicado por Zacarías (2015) con ligeras modificaciones, ensayando para su optimización distintas concentraciones (1 a 5% p/v) de suero de quesería siempre adicionado de extracto de levadura (Britania, Buenos Aires, Argentina), EL, al 5% (p/v); en presencia de glucosa (Cicarelli, San Lorenzo) (1% v/v) (SQ-EL-G) y en ausencia de la misma (SQ-EL). Además se ensayó el agregado de maltosa (Biopack, Buenos Aires) (1% v/v) al medio SQ-EL-G para ver si favorecía al crecimiento. Usando como base también al lactosuero se ensayó un medio semejante al caldo MRS formulado según Zacarías (2015), donde el suero de

quesería reemplazó las fuentes de nitrógeno extracto de carne y tripteína del medio comercial. Al mismo se lo sometió a un tratamiento enzimático con pepsina porcina 0,3% (p/v) (Merck, Buenos Aires, Argentina) para facilitar la asimilación de la fuente nitrogenada por W20. En ambos casos, con y sin hidrólisis, los medios se suplementaron post esterilización con una solución estéril de glucosa 1% (v/v).

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

Se ensayaron hidrolizados de dos harinas libres de gluten (Praga S.R.L., Córdoba, Argentina): sorgo y trigo sarraceno. Los hidrolizados se prepararon acorde a lo indicado por la Dra. Gerez, investigadora del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA) (comunicación personal, 26 de agosto, 2016). Se utilizó cada hidrolizado con distintas adiciones:

- Agregado de extracto de levadura (EL) 5% (p/v) previo a la esterilización.

- Agregado de hidratos de carbono en forma individual (concentración final 1 % p/v): glucosa (G), sacarosa (Cicarelli, San Lorenzo) (S), maltosa (M) y fructosa (Anedra, San fernando) (F).

- Agregado de combinaciones de azúcares: glucosa - maltosa (G-M) (cada una en concentración final 0,5 % p/v) y los 4 azúcares juntos (4A) (cada uno en concentración final 0,25 % p/v).

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

El medio fue cedido por la Dra. Páez y producido en Arla Foods (Porteña, Córdoba, Argentina). Se formuló según lo indicado por Lavari (2016) partiendo de permeado de suero en polvo reconstituido 9% (p/v) suplementado con 2,5 g/L de extracto de levadura, 2,5 g/L de triptona y 5 mL/L de solución Mg-Mn (MgSO₄ 2% p/v y 0,4% p/v de MnSO₄). Se ensayó el medio sin suplementar (PSQ) y suplementado con glucosa 1% (v/v) (PSQG).

d) *Medio Sour Dough Bacteria*, SDB

Este medio fue formulado específicamente por Kline y Sugihara (1971) para aislar y cultivar bacterias lácticas a partir de masas madres. Se preparó siguiendo sus indicaciones e incorporando las siguientes modificaciones:

- Sin ajuste de pH (6,5) con el agregado de una solución de glucosa estéril al 1% (v/v)

- Con ajuste de pH (5,6) con HCl 5 M y con el agregado de una solución de glucosa estéril al 1% (v/v)

- Sin ajuste de pH (6,5) con el agregado de una solución de maltosa estéril al 1% (v/v)

- Con ajuste de pH (5,6) con HCl 5 M y con el agregado de una solución de maltosa estéril al 1% (v/v)

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. El agregado de las soluciones de azúcar estéril, en los medios correspondientes, se realizó post-esterilización a partir de una solución concentrada de los hidratos de carbono previamente esterilizada a vapor fluyente por 30 minutos. Los medios fueron incubados en baño termostático a 30 °C y se tomaron muestras a tiempo inicial y a diferentes tiempos predeterminados. Para evaluar el desempeño de la cepa en los mismos se realizaron determinaciones de pH y recuentos de células viables en MRS agarizado en superficie. También se determinó la Absorbancia a 560 nm (densidad óptica, DO_{560}) en aquellos medios que presentaron un aspecto límpido luego del tratamiento térmico.

Resultados y discusión

Para todas las concentraciones de EL probadas, en el medio SQ-EL sin suplementar con glucosa, se observó que el crecimiento de W20 fue inferior comparado con el medio SQ-EL-G (Figura 1), comportamiento esperado debido a que las BAL son frecuentemente calificadas como “fastidiosas” ya que

presentan requerimientos nutricionales complejos. Debido a su limitada capacidad de biosíntesis necesitan de azúcares fácilmente fermentables (fuente de C), aminoácidos y péptidos cortos (fuente de N), vitaminas B y nucleótidos (factores de crecimiento) para lograr un adecuado desarrollo (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004). 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.

A su vez se vio que el agregado de maltosa al 1% (v/v) no mejoró el desarrollo de la cepa (Figura 2), como sí se había observado en experiencias anteriores. La maltosa se produce luego de que prepara la masa debido a la acción de las amilasas sobre el almidón libre (Kline y Sugihara, 1971). Se probó para simular condiciones presentes en el ambiente de las masas madres.

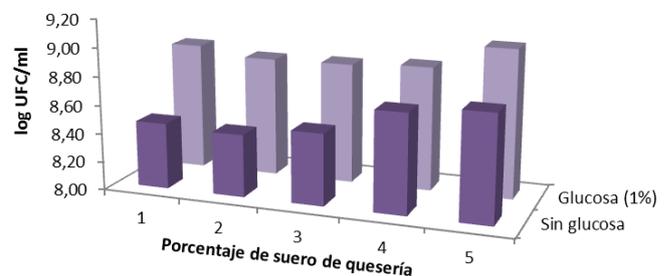


Figura 1. Efecto del porcentaje de suero de quesería y la adición de glucosa (1%) en el desarrollo de W20 (24 h, 30 °C) en el medio SQ.

Con respecto a los medios MRS-SQ, con y sin tratamiento enzimático, se comportaron igual entre sí y no difirieron respecto al SQG luego de 20 h de incubación (datos no mostrados), a causa de esto y debido a que su formulación es más compleja y costosa, y su preparación, laboriosa se descartó.

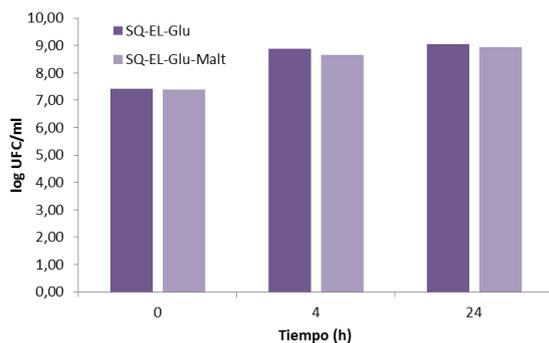


Figura 2. Comparación del efecto de maltosa (1%) y de glucosa (1%) en el crecimiento de W20 en el medio SQ.

Los estudios realizados en los hidrolizados de harina libre de gluten mostraron, luego de 20 h de incubación, que la adición de EL fue la que mayor crecimiento celular produjo para ambas harinas, presentando mayor diferencia con respecto a los demás aditivos en HS (9 órdenes log) (Figura 3), corroborando el requerimiento de fuentes nitrogenadas accesibles por parte de las BAL. Se observó un comportamiento inesperado respecto al pH en ambos medios, donde se esperaba que mayores disminuciones de pH se correspondan con un 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 3). 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.

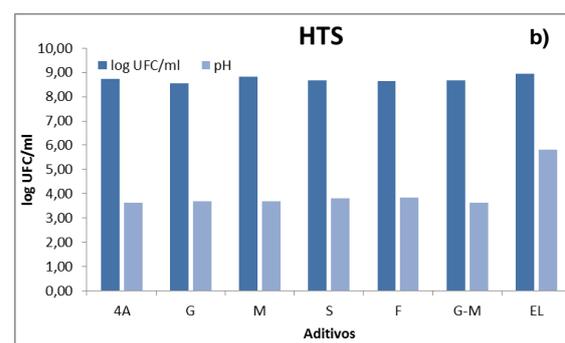
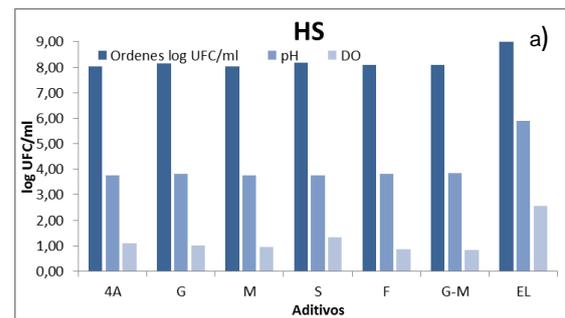


Figura 3. Efecto de los distintos aditivos en los hidrolizados con respecto al desarrollo (20 h, 30 °C) de W20 en **a)** medio HS mediante recuento microbiológico y mediciones de pH y DO₅₆₀ y **b)** medio HTS mediante recuento microbiológico y mediciones de pH .

En el medio HTS la turbidez post-esterilización no permitió realizar medidas de DO ya que fue parecida a la producida por el crecimiento de W20; a su vez se observó la formación de un precipitado que también interferiría con la técnica. El HS posibilitó realizar medidas de DO obteniéndose de la gráfica UFC/ml vs DO un $R^2=0,9501$, encontrando una

correlación lineal entre la DO y los recuentos microbiológicos (Figura4).

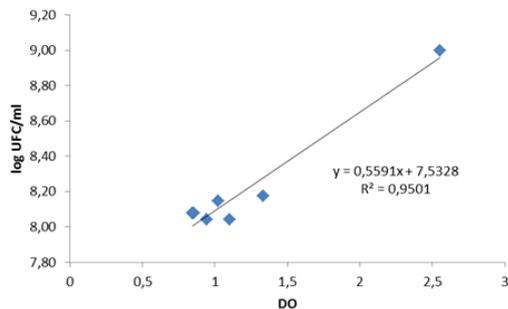


Figura 4. Relación entre el recuento de células viables y la densidad óptica del cultivo en medio HS

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 5); de acuerdo con Tayuan, Tannock y Rodtong (2011) quien estudiando un cultivo de *Weissella sp.* observó que para ese tiempo, se alcanzaba la fase estacionaria.

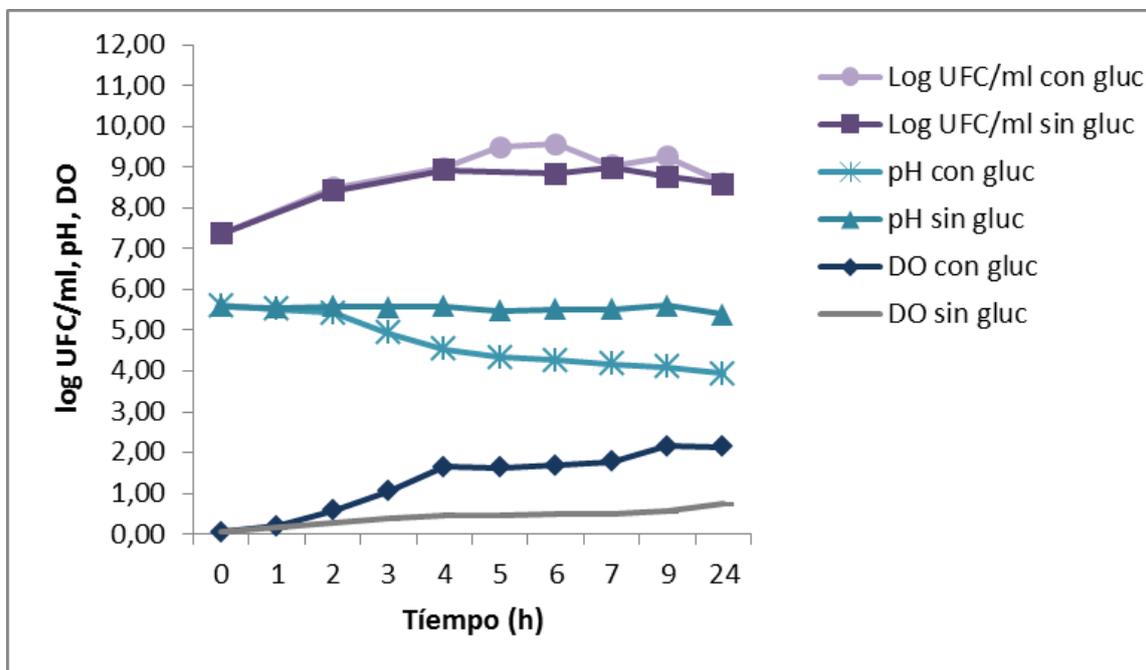


Figura 5. Crecimiento de W20 en el medio permeado de suero de quesería suplementado con glucosa (1%), PSQG, y sin suplementar, PSQ, durante 24 h de incubación a 30 °C.

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 5).

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 5). La ausencia de precipitado y partículas en suspensión en el medio permitió realizar lecturas en espectrofotómetro. Las mismas se correspondieron bien con las curvas de pH, comenzando a diferenciarse entre ambos medios a partir de las 2 h, con una marcada diferencia hasta el final de la incubación (ΔDO 1,4) (figura 5).

Al analizar la relación de las medidas de DO con los valores del recuento microbiológico, llamativamente no se obtuvo una buena correlación lineal que permita seguir el crecimiento de la masa celular a partir de esta técnica (Figura 6). 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.

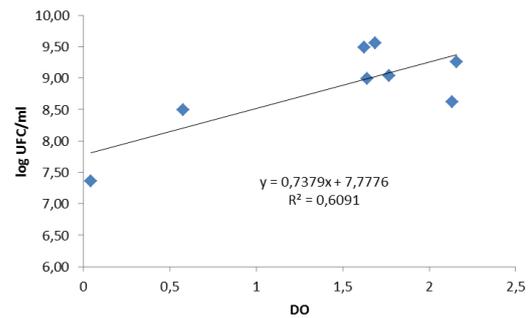


Figura 6. Relación entre el recuento de células viables y la densidad óptica en el cultivo PSQG.

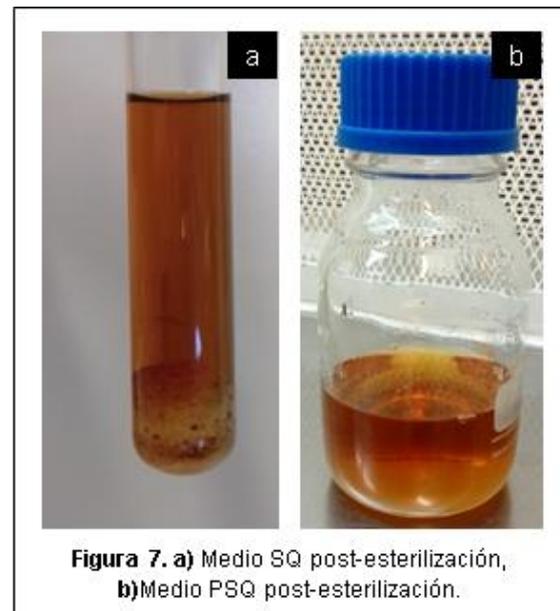
Finalmente se adoptó el medio PSQG como un potencial candidato para la producción de biomasa a escala industrial debido a que se observó una adecuada capacidad de desarrollo (elevada producción de biomasa en corto tiempo) de W20 en el permeado de suero en presencia de glucosa, comparable con el caldo MRS comercial. 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. Junto con el permeado son subproductos (generados en abundancia) de la elaboración de quesos, que de ser eliminados no sólo se desaprovechan los componentes de elevado valor nutricional que contienen, sino que además contaminan mucho por su elevada Demanda Química de Oxígeno (DQO) y Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO).

Tabla 1. Recuentos microbiológicos en el medio SDB con distintas combinaciones de pH y aditivos, alcanzados luego de 10 h de incubación a 30 °C

SDB	UFC/ml	
	pH 5,6	pH 6,5
Maltosa	2, 3.10 ⁸	2,4.10 ⁸
Glucosa	2,1.10 ⁸	3,1.10 ⁸

Por todo eso, es que varios logros tecnológicos permitieron transformar este efluente en una valiosa (en lo nutricional y en lo económico) materia prima, cuya utilización además resulta un beneficio para el medio ambiente. Una aplicación, entre muchas otras, es su uso en la formulación de medios de cultivo (Juliano, Muset y Castells, 2017). La utilización del permeado de suero de queso como medio de crecimiento toma importancia 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 se podría revalorizar como un medio de cultivo más económico que el SQ, y está compuesto mayoritariamente por lactosa. Otra ventaja de utilizar como medio el permeado, además del bajo costo, es que

las proteínas presentes en el SQ precipitan luego del tratamiento térmico generando inconvenientes durante el uso del medio de cultivo y la posterior disposición de la biomasa obtenida (Figura 7a y 7b). Algunos autores señalan que para la producción de biomasa no solo se necesita que el medio la recupere con buen rendimiento, sino que es conveniente disponer de caldos preferentemente transparentes (Brandt, 2014).



Otro atributo a favor del PSQ con respecto al SQ es el tiempo requerido para el desarrollo de W20. En el permeado de suero se observa que a las 4 h de incubación ya se obtiene un recuento celular de 10^9 UFC/ml (datos no mostrados), en cambio en el SQ a las 4 h de incubación se obtiene un recuento de $7 \cdot 10^8$ UFC/ml (Figura 2).

Conclusiones

El permeado de suero suplementado con glucosa y demás aditivos permitió la producción de 10^9 UFC/ml de células de *Weissella cibaria* 20 en tan solo 4 h, por lo que se convierte en un medio promisorio para posteriores estudios a gran escala. La utilización del lactosuero es una opción tecnológica innovadora debido a la posibilidad de dar un nuevo uso a las grandes cantidades producidas en las industrias lácteas. Se contribuye así a paliar, al menos de forma parcial, a 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. Este enfoque tiene dos ventajas: la utilización 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.
- Brandt, M. J. (2014). Starter cultures for cereal based foods. *Food Microbiology*, 37, 41-43.
- Guerzoni, M. E., Gianotti, A. y Serrazanetti, D. I. (2011). Fermentation as a tool to improve healthy properties of bread. En Preedy, V. R., Watson, R. R. y Patel, V. B. (Eds.), *Flour and breads and their fortification in health and disease prevention* (pp. 385-393). San Diego, USA: Academic Press, Elsevier.
- Juliano P., Muset G. B. y Castells, M. L. (2017). Valorización del Lactosuero. Instituto Nacional de Tecnología Industrial, compilado por Muset, G.B. 1ª ed. San Martín, Argentina ISBN 978-950-532-341-8.
- Kline L. y 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 doctoral en Ciencias Biológicas, FBCB-UNL), INTA, Rafaela e INLAIN, Santa Fe, Argentina.

Mäyra-Mäkinen, A. y Bigret, M. (2004). Industrial use and production of lactic acid bacteria. En: Salminen, S.; von Wright, A. y Ouwehand, A. (Eds.) 3^o Edición, *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (pp. 175-198). New York, USA. Marcel Dekker, Inc.

Peveerengo, M. R. (2018). "Caracterización tecnológica de *lactobacilos heterofermentantes*. Potencialidad de aplicación en masas panarias para prolongar la vida útil de pan para celíacos" (Tesis de pregrado).

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

Tayuan, C., Tannock, G. W. y Rodtong, S. (2011). Growth and exopolysaccharide production by *Weissella* sp. from low-cost substitutes for sucrose. *African Journal of Microbiology Research*, 5(22), 3693-3701. doi: 10.5897/AJMR11.486.

Zacarias M. F. (2015). "Bifidobacterias de leche materna aspectos microbiológicos, tecnológicos y funcionales". (Tesis doctoral en Ciencias Biológicas, FBCB, UNL), Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-Conicet), Santa Fe, Argentina.

Agradecimientos

Al INLAIN por haberme brindado los conocimientos científicos y tecnológicos en microbiología, por haberme facilitado los medios materiales necesarios para la realización de este trabajo y por darme la oportunidad de participar en este Congreso.

A la Dra. Roxana Páez por habernos cedido el permeado de suero utilizado en este estudio.

A los directores de este trabajo, Dra. María Luján Capra y Dra. Andrea Quiberoni por el valioso tiempo dedicado.

Financiamiento

"Lactobacilos heterofermentantes: diversidad y potencialidad tecnológica para mejorar la vida útil de pan para celíacos", Proyecto: 2010-074-14 (2016–2017) Convocatoria 2014 de la Secretaría de Estado de Ciencia, Tecnología e Innovación (Instrumento 2.1: Apoyo a proyectos de investigación sobre temas de interés provincial desarrollados por grupos de investigación pertenecientes al sistema de ciencia, tecnología e innovación, con institución adoptante. Directora: Dra. M.L. Capra, codirectora: Dra. A. Quiberoni.