

Comparación de dos cepas de *Lactobacillus plantarum* para su posible aplicación en alimentos fermentados

López-Salas, D.¹, Oney-Montalvo, J.E.¹, Ramírez-Rivera E.¹, Ramírez-Sucre, M. O.¹, y Rodríguez-Buenfil, I. M.¹

¹Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Sede Sureste. Tablaje Catastral 31264 Km. 5.5 Carretera Sierra Papacal-Chuburna Puerto. Parque Científico Tecnológico de Yucatán, 97302.

Mérida, Yucatán, México. Correo: irodriguez@ciatej.mx

Palabras clave: bacterias ácido-lácticas, fermentación, parámetros cinéticos, análisis reológico

Introducción

Los alimentos fermentados han adquirido gran importancia en la actualidad debido a que representan una alternativa rápida de producción (tiempos cortos de operación) y de bajo costo (equipo no especializado) para solucionar problemas nutricionales y de seguridad alimentaria en alimentos frescos y procesados. En productos de origen vegetal, las bacterias ácido-lácticas llevan a cabo la fermentación, degradando factores antinutricionales como fitatos o taninos o disminuyendo el pH del medio para que sus propias enzimas degraden estos compuestos. También, la fermentación ayuda a minimizar el efecto de alérgenos mediante la producción de enzimas proteolíticas que los reducen a péptidos o aminoácidos de fácil digestión. Además, funciona como método de biopreservación al impedir el desarrollo de microorganismos patógenos como *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* así como de descomponedores que van desde levaduras como *Candida albicans* hasta hongos del género *Penicillium* [1]. Uno de los géneros bacterianos más utilizados para las fermentaciones ácido-lácticas es *Lactobacillus* cuya diversidad genética le permite adaptarse y sobrevivir en ambientes variados y desarrollando características distintivas, como el *Lactobacillus reuteri* que produce enzimas (principalmente variantes de la tRNA ligasa) en el tracto intestinal de vertebrados [2] para este fin. La fermentación con bacterias ácido-lácticas confiere características organolépticas únicas (color, sabor, aroma) y ha demostrado ser efectiva incluso en la reducción de la concentración de micotoxinas e insecticidas en alimentos [1].

Debido a que las fermentaciones son sistemas dinámicos, los cambios fisicoquímicos que sufre la materia prima se ven reflejados en parámetros como el tipo, cantidad y velocidad de producción del metabolito deseado. Por ejemplo, la calidad de la fermentación de pepinos con bacterias ácido-lácticas tiene como parámetros críticos la cantidad de ácido láctico producido (mínima de 0.6% (w/v)) y el consumo de azúcares disponibles, para asegurar su conservación [3]. Sin embargo, la fermentación microbiana se orienta bien a la generación de productos, dependiendo de las condiciones del medio en el que crece, bien para el incremento de la población o bien para su mantenimiento (producción de energía para la supervivencia de la célula). El balance correcto entre el crecimiento y el mantenimiento celular en fermentaciones ácido-lácticas es fundamental para lograr efectos positivos en la calidad de los productos que se deseen transformar [3]. Recientemente, se han llevado a cabo estudios que relacionan el efecto de la fermentación con bacterias ácido-lácticas con la mejora de la textura de algunos lácteos, incrementando su viscosidad, la cual está asociada con su capacidad para producir exopolisacáridos y resultando en espesantes alternativos para la industria alimentaria [4].

Lactobacillus plantarum es una de las bacterias más empleadas en fermentaciones ácido-lácticas, debido a su presencia en plantas, lácteos y carne, al tiempo que es un habitante natural del tracto gastrointestinal de personas que además destaca por su diversidad fenotípica y genotípica. Esta ubicuidad se debe a su capacidad de fermentar diferentes carbohidratos, de metabolizar diferentes compuestos polifenólicos, producir un amplio espectro de enzimas (principalmente proteolíticas, como las fitasas), y de sintetizar compuestos antimicrobianos y producir exopolisacáridos [1,4]. Además, es un microorganismo homofermentativo en presencia de hexosas cuyo metabolismo se orienta a la producción exclusiva de ácido láctico, o heterofermentativo facultativo en presencia de otros carbohidratos [3] y se cree que el ambiente en el que se desarrolla afecta la relación entre su variabilidad genética y su evolución [2].

Debido a la evaluación de la capacidad de fermentación de bacterias ácido-lácticas mediante el uso de parámetros cinéticos [3], al interés del uso de bacterias propias de la región para el desarrollo de productos fermentados y para confirmar el efecto de la fuente de aislamiento sobre el desempeño de fermentación de

L. plantarum, se planteó como objetivo de este trabajo comparar los parámetros cinéticos de crecimiento y producción de ácido láctico así como reológicos de una cepa de *L. plantarum* silvestre (LPSIL) con los de una cepa de *L. plantarum* comercial (LPCOM) para su aplicación en productos fermentados.

Metodología

Para la comparación de las bacterias se emplearon la cepa comercial *Lactobacillus plantarum* LDL (SACCO, ECGC 13110402) usada en la elaboración de quesos, y la silvestre, *Lactobacillus plantarum* YFPB1BMX (GenBank: FJ538586.1) aislada e identificada previamente a partir de chile habanero de la Península de Yucatán en la Sede Sureste del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). La cinética se realizó en matraces con 300 mL de caldo de Man, Rogosa, Sharpe (MRS), ajustando el inóculo de ambas cepas para obtener una concentración al tiempo 0 h de 4.4×10^7 cel mL⁻¹. Se tomaron alícuotas de 10 mL para los tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 24 h, estas fueron centrifugadas a 4700 rpm, 4 °C, 20 min (Megafuge 40R, ThermoScientific) y se separaron los sobrenadantes de la biomasa conservándolos en congelación a -20°C. Para medir la concentración de bacterias por peso seco, las células recuperadas se procesaron de acuerdo con lo realizado por Colli-Turriza, 2007 [5]. Utilizando el sobrenadante se determinaron las concentraciones de azúcares reductores con una modificación del método de Miller, 1959 [6]. El sobrenadante también fue empleado para la determinación de ácido láctico por el método espectrofotométrico de Borshchevskaya, 2016 [7].

Parámetros cinéticos. Como parámetros cinéticos para comparar ambas cepas se calcularon, para la producción de biomasa: la velocidad de producción de biomasa (μ) y el tiempo de duplicación (t_d); para la producción de ácido láctico: la velocidad de producción de ácido láctico (Q_P), el rendimiento de producción de ácido láctico ($Y_{P/S}$), la eficiencia de fermentación de ácido láctico (E), el total de ácido láctico producido (ΔP), la productividad total (P_{total}) y la velocidad de consumo de azúcares reductores ($-Q_S$). Los parámetros μ , Q_P y $-Q_S$ se calcularon con los valores en la fase de crecimiento exponencial de la cinética de producción de biomasa y ácido láctico, así como los de consumo de azúcares reductores contra el tiempo empleando las Ecuaciones 1, 2 y 3, respectivamente. Se definió la fase exponencial como la serie de datos de la cinética con el mejor ajuste a una ecuación lineal, definido por el mayor coeficiente R². El resto de los parámetros se calcularon aplicando directamente las ecuaciones 4-8.

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= \mu t \text{ (Ecuación 1)} & \frac{dS}{dt} &= -Q_S t \text{ (Ecuación 3)} & Y_{P/S} &= \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \text{ (Ecuación 5)} & \Delta P &= P_f - P_0 \text{ (Ecuación 7)} \\ \frac{dP}{dt} &= Q_P t \text{ (Ecuación 2)} & t_d &= \frac{\ln(2)}{\mu} \text{ (Ecuación 4)} & E &= \frac{Y_{P/S}}{Y_{P/S}^*} \times 100 \text{ (Ecuación 6)} & P_{total} &= \frac{P_f - P_0}{t_f} \text{ (Ecuación 8)} \end{aligned}$$

Donde: X , es el peso seco de la bacteria en el tiempo (g L⁻¹); t , es el tiempo de fermentación (h); P , es la concentración de ácido láctico en el tiempo (g L⁻¹); S , es la concentración de azúcares reductores en el tiempo (g L⁻¹); P_f , es la concentración de ácido láctico en el tiempo 24 h (g L⁻¹); P_0 , es la concentración de ácido láctico en el tiempo 0 h (g L⁻¹); S_f , es la concentración de azúcares reductores en el tiempo 24 h (g L⁻¹); S_0 , es la concentración de azúcares reductores en el tiempo 0 h (g L⁻¹); $Y_{P/S}^*$ es el rendimiento teórico de producción de ácido láctico (en este caso su valor es de 1 basado en la ecuación estequiométrica para la producción homofermentativa de ácido láctico, Ecuación 9); en el tiempo 24 h.



Preparación de muestra. Para evaluar las características reológicas y viscoelásticas propias de la cepa se recuperó la biomasa de 200 mL de fermento de 24 h de cada cepa centrifugando las muestras a 4700 rpm, 4 °C, 15 min (Megafuge 40R, ThermoScientific), una vez recuperada la biomasa se homogenizó con 10 mL de agua destilada para ser sometida al mismo proceso de centrifugación.

Humedad. Se determinó la humedad de las muestras empleando un analizador de humedad termobalanza (OHAUS, MB120). La humedad de todas las muestras se ajustó a 74.56% (correspondiente a la muestra más húmeda).

Análisis reológico.

Flujo. El comportamiento al flujo se evaluó obteniendo los valores de esfuerzo cortante frente a la velocidad de deformación (de 1 a 100 s⁻¹) después de 24 h de fermentación y en medio MRS (blanco). Las curvas se ajustaron a la ecuación de fluidos newtonianos (Ecuación 10) que describe el comportamiento de fluidos de viscosidad constante. El cambio en la viscosidad ($\Delta\eta$) se determinó como el valor absoluto de la diferencia entre la viscosidad de cada muestra con la del medio.

$$\tau = \eta\gamma \text{ (Ecuación 10)}$$

Donde: τ , esfuerzo cortante (mPa), η , viscosidad (mPa·s) y γ , velocidad de deformación (s⁻¹).

Temperatura. Se evaluó la viscosidad del medio en función de la temperatura mediante una rampa de temperaturas (25-125 °C, a 5.0 °C min⁻¹ y 2 s⁻¹). Este ensayo se realizó en un reómetro de esfuerzo controlado (TA Instruments, DHR₂; EE. UU.), con una geometría de platos paralelos (40 mm de diámetro) y un *gap* de 800 µm, debido a la pequeña cantidad de muestras (2 mL aproximadamente) para determinar la temperatura de gelificación (T_G) y la viscosidad máxima ($\eta_{m\acute{a}x}$).

Viscoelasticidad. Las propiedades viscoelásticas fueron evaluadas en un reómetro de esfuerzo controlado (TA Instruments, DHR₂; EE. UU.) con una geometría de cilindros concéntricos (15 mm de diámetro) y un espacio (*gap*) de 1040 µm, estas fueron evaluadas en la región viscoelástica lineal con ensayos de amplitud de deformación con incrementos logarítmicos (0.01 a 100%) a una frecuencia constante de 1 Hz. Posteriormente se realizaron barridos de frecuencia angular (0.01 a 200 rad s⁻¹), con una deformación del 0.1% mediante el análisis de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G''), y $\tan(\delta)$ en función de la frecuencia. Para su análisis se eligieron los valores correspondientes a una frecuencia de 1 Hz.

Se realizaron análisis estadísticos para comparar estos datos mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía con el *software* Statgraphics Centurion XVI.I versión 16.1.03 (StatPoint Technologies, 2010).

Resultados y discusión

En la Figura 1 se presentan las curvas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de ácido láctico para *Lactobacillus plantarum* comercial (LPCOM) y *Lactobacillus plantarum* silvestre (LPSIL). En cuanto al crecimiento reportado como peso seco, en ambos casos se observa una fase de adaptación de 4 h para posteriormente crecer de forma exponencial hasta el tiempo 11 h en el que se observa que entra a la fase estacionaria con una biomasa estable hasta las 24 h de fermentación (2.2 g/L y 2.5 g/L para LPCOM y LPSIL, respectivamente). La curva de crecimiento de LPSIL se observa ligeramente por encima de la de LPCOM, lo que indica una mayor producción de biomasa celular en el mismo tiempo de fermentación. Con respecto a la producción del ácido láctico, de manera similar al crecimiento, se observa la producción lineal del ácido láctico a partir del tiempo 4 h, esta se extiende hasta el tiempo 12 h para ambas cepas, quienes alcanzan la más alta concentración de ácido láctico después de 24 h de fermentación. Se observa que la cepa silvestre tiene la mayor concentración de ácido láctico al final de la fermentación (25.41 g/L contra 23.08 g/L de la cepa comercial). En cuanto al consumo de sustrato, se observa un comportamiento similar en ambas curvas, exhibiendo un consumo más acelerado por la cepa LPSIL en las primeras 13 h de fermentación, pero a las 24 h se obtuvo la concentración mínima de azúcares en ambos casos de 1.10 y 1.23 g/L para LPCOM y LPSIL, respectivamente. En esta figura 1 se confirma que la producción del ácido láctico está asociada al crecimiento, por lo que se clasifica como un metabolito del tipo I o primario.

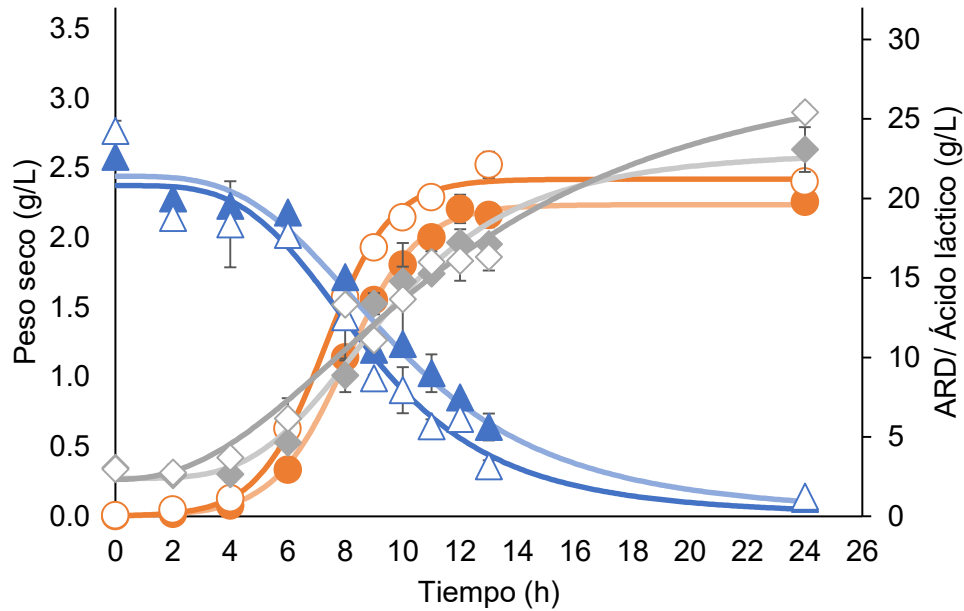


Figura 1. Gráfico de la cinética de crecimiento de ambas cepas basada en producción de biomasa (peso seco), consumo de sustrato (concentración de azúcares reductores) y generación de producto (concentración de ácido láctico). (●) peso seco de LPCOM, (○) peso seco de LPSIL, (▲) concentración de azúcares reductores de LPCOM, (△) concentración de azúcares reductores de LPSIL, (◆) concentración de ácido láctico de LPCOM y (◇) concentración de ácido láctico de LPSIL. Abreviaturas: LPCOM, *Lactobacillus plantarum* comercial; LPSIL, *Lactobacillus plantarum* silvestre; ARD, concentración de azúcares reductores directos.

Los parámetros cinéticos obtenidos se muestran en la Tabla 1. En lo relacionado a la producción de biomasa se encontraron valores de μ de $0.2997 \pm 0.0015 \text{ h}^{-1}$ y de $0.3329 \pm 0.0022 \text{ h}^{-1}$ para LPCOM y LPSIL, así como valores de t_d de $2.31 \pm 0.01 \text{ h}$ y $2.08 \pm 0.01 \text{ h}$, respectivamente. Ambos parámetros son estadísticamente diferentes entre ambas cepas con valores de P de 0.003 para μ y de 0.003 para t_d . LPSIL tiene la mayor velocidad de crecimiento y el menor tiempo de duplicación de ambas cepas. En estudios previos se ha encontrado que las mayores diferencias genéticas entre cepas de *L. plantarum* de diferente origen están en procesos involucrados en el crecimiento, como el metabolismo de aminoácidos y la síntesis de la pared celular [2]. En esta ocasión la variación entre cepas de la misma especie, de diferente origen para la producción de biomasa parece ser mayor inclusive que en cepas de diferente especie, pues en otros estudios no se encontraron diferencias entre μ y t_d de LPSIL y una cepa de *Lactococcus lactis* [5].

En lo que concierne a la producción de ácido láctico, los valores de Q_P , $Y_{P/S}$, E , ΔP , P_{total} y $-Q_S$ por cepa (tabla 1), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de estos parámetros (valores de P de 0.3396, 0.5327, 0.5293, 0.2306, 0.2397 y 0.5109), aunque LPSIL aparentemente tiene mayores valores de $Y_{P/S}$, E , ΔP , P_{total} y $-Q_S$. Se observa cómo en ambos casos el metabolismo de la glucosa fue homofermentativo, con valores de rendimiento cercanos a 1. Este proceso fermentativo podría ser un dominio conservado no sólo entre cepas de *Lactobacillus plantarum* sino también entre otras cepas ácido-lácticas [2], pues en estudios anteriores se encontraron valores similares de eficiencia de producción de ácido láctico (0.994) en MRS para LPSIL y una cepa de *Lactobacillus acidophilus* (0.985) [5]. Sin embargo, esta conservación podría sólo estar asociada al metabolismo de hexosas pues se ha encontrado que otro punto de variación entre cepas de *L. plantarum* de diferente origen está en el metabolismo de carbohidratos [2].

Las curvas de flujo para el blanco MRS, LPCOM y LPSIL fueron bien ajustadas por la Ecuación 10 (valores de $R^2 = 0.9841$, 0.9985 y 0.9985 , respectivamente). De la diferencia de valores entre las viscosidades de las

muestras y el blanco se obtuvieron los valores de las disminuciones de la viscosidad del medio de 0.145 ± 0.012 mPa·s en el caso de LPCOM y de 0.112 ± 0.010 mPa·s para LPSIL (ver Tabla 1). No se observaron diferencias significativas entre las mismas ($P=0.093$). Este cambio en la viscosidad inicial puede estar asociada a la disminución de la concentración de glucosa del medio, o en caso de producir exopolisacáridos, a que ninguna cepa forma complejos con proteínas en el medio como ocurre con la caseína, en la que estos complejos incrementan la viscosidad [4].

El módulo de almacenamiento exhibió valores más altos en el caso de LPSIL, aunque sin diferencias significativas ($G'_{LPSIL} = 1.85 \pm 0.64$ Pa; $G'_{LPCOM} = 0.20 \pm 0.15$ Pa, $P = 0.071$); en contraste, ambas cepas presentaron módulos de pérdida similares ($G''_{LPCOM} = 0.15 \pm 0.08$ Pa; $G''_{LPSIL} = 0.63 \pm 0.25$ Pa, $P = 0.124$), lo que se refleja en un menor valor de $\tan(\delta)$ para LPSIL, aunque sin diferencias significativas ($\tan(\delta)_{LPSIL} = 0.34 \pm 0.02$, $\tan(\delta)_{LPCOM} = 0.84 \pm 0.23$, $P = 0.071$). Asimismo, no se encontraron diferencias significativas entre las temperaturas de gelificación de las cepas ($T_{g,LPCOM} = 107.1 \pm 0.6$ °C y $T_{g,LPSIL} = 107.4 \pm 1.2$ °C, $P = 0.725$) ni entre sus valores de viscosidad máxima ($\eta_{máx,LPCOM} = 12500 \pm 800$ mPa·s y $\eta_{máx,LPSIL} = 12900 \pm 3800$ mPa·s, $P = 0.883$). La mayor diferencia entre ambas se encuentra en el módulo de almacenamiento (G'), al tener un mayor valor de G' , LPSIL representa un sistema más estructurado. Esta característica de la cepa podría reflejarse en su capacidad de producir biopelículas, que, en fermentaciones en medio sólido se asocian con un incremento en el rendimiento de producción de metabolitos de interés [8].

Tabla 1. Parámetros cinéticos y reológicos para cada una de las cepas.

Parámetro	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	Comercial (LPCOM)	Silvestre (LPSIL)
<i>Producción de biomasa</i>		
μ (h ⁻¹)	0.2997 ± 0.0015 ^a	0.3329 ± 0.0022 ^b
t_d (h)	2.31 ± 0.01 ^a	2.08 ± 0.01 ^b
<i>Producción de ácido láctico</i>		
Q_P (h ⁻¹)	1.9657 ± 0.1206 ^a	1.8059 ± 0.1359 ^a
$Y_{P/S}$	0.93 ± 0.08 ^a	0.97 ± 0.01 ^a
E (%)	93.14 ± 8.06 ^a	97.49 ± 1.35 ^a
ΔP (g L ⁻¹)	20 ± 1.79 ^a	22.4 ± 0.89 ^a
P_{total} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0.83 ± 0.07 ^a	0.94 ± 0.04 ^a
$-Q_s$ (h ⁻¹)	1.6679 ± 0.0437 ^a	1.8201 ± 0.2678 ^a
<i>Propiedades reológicas</i>		
$\Delta\eta$ (mPa·s)	0.145 ± 0.012 ^a	0.112 ± 0.010 ^a
T_g (°C)	107.1 ± 0.6 ^a	107.4 ± 1.2 ^a
$\eta_{máx}$ (mPa·s)	12500 ± 800 ^a	12900 ± 3800 ^a
<i>Viscoelasticidad</i>		
G' (Pa)	0.20 ± 0.15 ^a	1.85 ± 0.64 ^a
G'' (Pa)	0.15 ± 0.08 ^a	0.63 ± 0.25 ^a
$\tan(\delta)$	0.84 ± 0.23 ^a	0.34 ± 0.02 ^a

Nota: Los resultados con la misma letra como superíndice no tienen diferencias significativas a un 95% de confianza, si estas letras difieren, hay diferencias significativas entre los valores. Abreviaturas: LPCOM, *Lactobacillus plantarum* comercial; LPSIL, *Lactobacillus plantarum* silvestre.

Conclusiones

Se encontraron diferencias significativas en la velocidad de producción de biomasa y en el tiempo de duplicación de ambas cepas. La cepa silvestre (LPSIL) tuvo el mejor desempeño al haber obtenido el mayor valor de μ y el menor t_d , esta variación posiblemente está relacionada al metabolismo de aminoácidos y a la síntesis de la pared celular. No se encontraron diferencias significativas entre las cepas en ninguno de los parámetros de producción de ácido láctico, esto puede deberse a la poca variabilidad en el metabolismo de glucosa dentro del género *Lactobacillus*. Ambas cepas presentaron una disminución similar de la viscosidad

en función del blanco sin diferencias significativas que puede deberse al cambio en la concentración de glucosa y a la no formación de complejos entre los exopolisacáridos de membrana y las proteínas del medio. Finalmente, en cuanto a las propiedades viscoelásticas, el sistema más estructurado de LPSIL pudiera estar asociado a la formación de una biopelícula, aunque no presentó diferencias con el sistema de LPCOM.

En futuras investigaciones se recomienda evaluar medios con diferentes fuentes de carbono y analizar otras variables de respuesta como la concentración de metabolitos secundarios entre los que pueden estar los compuestos volátiles. Una prueba de adherencia de las cepas en diferentes sustratos sólidos permitiría un mejor entendimiento del efecto de la viscoelasticidad de cada una con más detalle.

Bibliografía

- [1] Licandro H., Ho P. H., Nguyen T. K. C., Petchkongkaew A., Nguyen H. V., Chu-Ky S., Nguyen T. V. A, Lorn D., Waché Y. (2020). How fermentation by lactic acid bacteria can address safety issues in legumes food products? *Food Control*. **110**(2020):106957
- [2] Martino M.E., Bayjanov J.R., Caffrey B.E., Wels M., Joncour P., Hughes S., Gillet B., Kleerebezem M., van Hijum S.A.F.T, Leulier F. (2016). Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats. *Environ. Microbiol.* **18**(12):4974-4989
- [3] Passos F.V., Fleming, H.P., Ollis, D.F., Felder, R.M., McFeeters, R.F. (1994). Kinetics and modeling of lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(7): 2627-2636.
- [4] Wang J., Zhao X., Tian Z., Yang Y., Yang Z. (2015). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydr. Polym.* **125**: 16-25.
- [5] Colli-Turriza N. Tesis de Licenciatura (2007). *Estudio de la capacidad fermentativa de dos bacterias ácido-lácticas aisladas del chile habanero para su posterior uso en una salsa fermentada*. Instituto Tecnológico Superior de Calkiní. Calkiní, México.
- [6] Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31** (3): 426-428.
- [7] Borshchevskaya L.N., Gordeeva T.L., Kalinina A.N., Sineokii S.P. (2016). Spectrophotometric determination of lactic acid. *J. Anal. Chem.* **71**(8): 755-758.
- [8] Klapper I., Rupp C.J., Cargo R., Purvedorj B., Stoodley P. (2002). Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties. *Biotechnol. Bioeng.* **80** (3): 289-296.