

## Aislamiento y evaluación funcional de bacterias lácticas autóctonas de Santiago del Estero

Carol, Juan J.<sup>1,2</sup>; Sesín, Abraham A.<sup>1,2</sup>; Gómez, Jorge N.<sup>1,2</sup>; Iturriaga, Laura B.<sup>1,2</sup>; Ledesma, Ana E.<sup>1,3</sup> y Bustos, Ana Y.<sup>1,2</sup>

1) Centro de Investigación en Biofísica Aplicada y Alimentos (CIBAAL-UNSE-CONICET), RN 9- Km 1125, (4206) Santiago del Estero, Argentina

nicolasgoib@gmail.com ; carolpazjuanjose@gmail.com; abrahamsesin97@gmail.com

(2) Facultad de Agronomía y Agroindustrias (FAyA), Universidad Nacional de Santiago del Estero. Av. Belgrano Sur 1912, (4200) Santiago del Estero, Argentina. abustos@uspt.edu.ar

(3) Departamento Académico de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnologías Universidad Nacional de Santiago del Estero. Av. Belgrano Sur 1912, (4200) Santiago del Estero, Argentina anael@unse.edu.ar

### RESUMEN

Las bacterias lácticas (BAL) presentan gran potencial tecnológico, ya que proveen características sensoriales, tecnológicas y texturales distintivas a los productos lácteos, como los quesos. Además, muchas de ellas son consideradas probióticas. El objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar funcionalmente BAL presentes en quesos de cabra elaborados artesanalmente en la provincia de Santiago del Estero. Un total de 50 cepas fueron aisladas e identificadas como bacilos y cocos Gram positivos. Entre ellas, se seleccionaron 14 cepas para su evaluación tecnológica y funcional. Todas las cepas estudiadas, demostraron capacidad de crecer y acidificar la leche, con producción de ácido láctico. Además, todas las cepas mostraron actividad proteolítica. La concentración de aminoácidos en leche fermentada durante 24 h, se situó en un rango comprendido entre 0,05 y 6,08 mg/mL.

Las cepas sometidas a estrés ácido (pH = 2,5) presentaron porcentajes de supervivencia superiores al 93%. Además, 12 de las 14 cepas exhibieron tasas de supervivencia superiores al 75 % en presencia de ácido taurodeóxicólico. Por el contrario, en presencia de ácido deóxicólico, sólo tres cepas alcanzaron tasas de supervivencia del 70%, mientras que las restantes presentaron valores en un rango de 38 a 67 %. Finalmente, tres cepas fueron capaces de inhibir a la cepa patógena *E. coli*.

Palabras claves: bacterias lácticas- probióticos- cepas autóctonas

### ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) have great technological potential, as they provide distinctive sensory, technological and textural characteristics to dairy products, such as cheeses. Also, many of them are considered probiotics. The objective of the present work was to isolate and functionally characterize LAB present in artisan-made goat cheeses in the province of Santiago del Estero. Fifty strains were isolated and identified as Gram-positive bacilli and cocci. Among them, 14 strains were selected for their technological and functional evaluation. All the strains studied showed the ability to grow and acidify milk, producing lactic acid. In addition, all strains showed proteolytic activity. The amino acid concentration in 24 h- fermented milk was in a range between 0.05 and 6.08 mg/mL.

The strains subjected to acid stress (pH = 2.5) presented survival percentages higher than 93%. Furthermore, 12 of the 14 strains exhibited survival rates greater than 75% in the presence of taurodeoxycholic acid. In contrast, in the presence of deoxycholic acid, only three strains achieved survival rates of 70%, while the others reached values in a range of 38 to 67%. Finally, three strains were able to inhibit the pathogenic strain *E. coli*.

Keywords: acid lactic bacteria- probiotics- autochthonous strains

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas (BAL) comprenden un amplio grupo de microorganismos en forma de cocos y bacilos, Gram-positivos, anaerobios y microaerofílicos, catalasa-negativos, que fermentan los carbohidratos con formación de ácido láctico como principal producto final (Font de Valdez, 2005). Las BAL presentan gran potencial tecnológico, ya que proveen características sensoriales, tecnológicas y texturales distintivas a los productos lácteos, como los quesos. En efecto, durante la fermentación, se producen numerosos metabolitos y subproductos que pueden mejorar las propiedades organolépticas de los alimentos, como así también aumentar significativamente su valor nutricional. Sin embargo, no todas las cepas que constituyen la microbiota presente en un queso son capaces de contribuir con estos atributos (Pavunc, 2012; Speranza, 2015).

En este sentido, la actividad proteolítica es uno de los parámetros enzimáticos esenciales, tanto para el desarrollo y crecimiento de las bacterias, como así también para la elaboración de productos lácteos fermentados, mientras que la actividad acidificante es otra característica esencial de las potenciales cepas a usar como cultivos iniciadores (Torres, 2014; Seddik, 2017).

Por otra parte, además de su potencial tecnológico, ha sido ampliamente demostrado que algunas cepas de BAL, consumidas en cantidades apropiadas pueden ejercer numerosos efectos benéficos en el hospedador, condición conocida como probiótica (FAO/OMS, 2006; Hill, 2014). No obstante, las cepas de BAL probióticas deben sobrevivir el pasaje por el tracto gastrointestinal para ejercer sus beneficios. Allí, la acidez estomacal (Fiocco, 2019) y la presencia ácidos biliares (Bustos, 2018), representan las principales barreras fisiológicas que regulan su ingreso. En efecto, el pH bajo del estómago es el primer obstáculo clave para el establecimiento de las bacterias en el intestino. Además, por su carácter detergente, los ácidos biliares, principales constituyentes de la bilis, presentan potente actividad antimicrobiana (Bustos, 2018). Teniendo en cuenta que, en Santiago del Estero se encuentra la mayor producción de leche de cabra del país y que la mayor parte se destina a la fabricación de quesos artesanales, la selección de cepas autóctonas con características relevantes permitiría mejorar y optimizar los procesos de fermentación. Además, el empleo de cepas potencialmente probióticas capaces de desarrollar en la matriz láctea, permitiría el diseño

de un queso funcional. Por lo expuesto, el presente trabajo tiene por objetivo aislar y caracterizar BAL a partir de quesos regionales elaborados con leche de cabra y evaluar sus propiedades funcionales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1 *Aislamiento de cepas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento*

Se realizaron aislamientos a partir de quesos de cabra elaborados artesanalmente en la localidad de Los Pocitos del departamento Capital de la Provincia de Santiago del Estero. Se tomaron tres muestras de diferentes quesos de 10 g cada una, y se las disolvieron en 90 mL de solución de cloruro de sodio al 0,8 % (p/v). Luego, se realizaron diluciones decimales hasta  $10^{-4}$  y se realizó la siembra en superficie de las dos últimas diluciones en placas de agar MRS. Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 48 horas en condiciones de microaerofilia. Pasado este tiempo, se realizaron los recuentos correspondientes y se expresaron los resultados como log UFC/mL. Las colonias se recuperaron en 1 mL de caldo MRS para los posteriores análisis de identificación.

### 2 *Identificación fenotípica*

La identificación macroscópica consistió en observar la forma, el tamaño, la superficie y el color de las colonias.

Luego, las cepas seleccionadas fueron caracterizadas fenotípicamente empleando la prueba de catalasa y coloración de Gram. Las cepas catalasa negativas y Gram positivas fueron clasificadas presuntivamente como BAL y nombradas como CB, acompañado del número de identificación.

A partir de estos aislamientos, se seleccionaron 11 bacilos, teniendo en cuenta el potencial tecnológico y probiótico de los lactobacilos y 3 cepas de cocos.

### 3 *Evaluación tecnológica de las cepas*

Las cepas aisladas fueron inoculadas al 3% (p/v) en leche descremada estéril reconstituida al 10%, para evaluar su capacidad de crecimiento en leche, capacidad acidificante y acidez titulable.

#### 3.1 *Capacidad de crecimiento en leche*

La capacidad de crecimiento en leche se realizó por recuento en placa. Se tomaron muestras al inicio de la incubación ( $t_0$ ) y luego de 24 horas ( $t_{24}$ ) a 37 °C, en condiciones de microaerofilia.

Para ello, se realizaron diluciones decimales en solución de cloruro de sodio al 0,8 % (p/v) que luego se sembraron en profundidad en placas de agar MRS y se incubaron a 30 °C en microaerofilia.

Los recuentos de colonias fueron expresados como logaritmo de UFC/mL.

### 3.2 Actividad acidificante y acidez titulable

Los valores de pH de cada uno de los tubos de leche inoculados con las diferentes cepas se determinaron empleando un pHmetro. Las medidas se realizaron a dos tiempos diferentes: al inicio de la incubación ( $t_0$ ) y luego de 24 horas de incubación ( $t_{24}$ ). Previamente, el pHmetro fue calibrado usando soluciones estándar de pH 4,0 y 7,0.

La acidez titulable se realizó siguiendo la técnica especificada en las normas ISO/TS 11869IDF/RM 150 de amplio uso internacional. La acidez titulable se calculó como la cantidad de hidróxido de sodio necesario para titular 100 g de muestra a un pH de 8,30.

Para ello, se tomaron muestras de 5 mL de leche inoculada al inicio y luego de 24 horas de incubación a 37 °C. La titulación se realizó por duplicado empleando una solución titulante de hidróxido de sodio 0,1 N y fenolftaleína al 0,1 % como solución indicadora.

Los resultados obtenidos a través de esta técnica se expresaron en miligramos de aminoácidos libres por mililitro. El cálculo se realizó a partir de la siguiente fórmula:

$$I = \frac{V \times 0,9}{m} \quad (1)$$

Donde  $I$  son los milimoles de ácido láctico,  $V$  es el volumen (en mL) de titulante utilizado y  $m$  es la masa (en g) de referencia para la muestra.

### 3.4 Actividad proteolítica

Se tomaron muestras de 500  $\mu$ L de los tubos de leche inoculados, al inicio y final de la incubación. A los mismos se les añadió 1000  $\mu$ L de ácido tricloroacético, para desnaturalizar las proteínas del medio. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas a 2500  $\times$  g durante 10 minutos y a 10 °C. Se conservaron los sobrenadantes a -20 °C hasta su análisis. Los aminoácidos libres se cuantificaron empleando el método de OPA (O-phthaldialdehído). Para ello, se tomaron 50  $\mu$ L de muestra y se les añadió 1000  $\mu$ L de reactivo de OPA (25 mL de tetraborato de sodio 100 mM, 2,5 mL de duodecil sulfato de sodio al

20 %, 40 mg de OPA en 1 mL de metanol, y 100  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol, aforándose a 50 mL con agua destilada). Las soluciones reposaron durante 2 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Por último, se midió la absorbancia de las muestras a 340 nm empleando un espectrofotómetro UV-Visible. El grado de proteólisis se determinó por diferencia frente a un control sin inóculo utilizando una curva de calibración construida con soluciones patrón de glicina (rango de concentración de 0,001 a 0,009 mg/ml).

## 4 Resistencia a condiciones del tracto gastrointestinal

### 4.1 Resistencia ácida

Las cepas se inocularon al 20% p/v en tubos con caldo MRS estéril acidificado hasta pH 2,5 con HCl. Los mismos fueron incubados en estufa a 37 °C. Se midió la absorbancia a 560 nm, a las 0, 1,5 y 3 hs. Los resultados se expresaron como porcentajes de supervivencia comparados con el valor inicial ( $t_0$ ).

$$\% \text{ Supervivencia} = \frac{DO_{\text{ensayo}}}{DO_{\text{control}}} * 100 \quad (2)$$

Donde el numerador es la Densidad Óptica (DO) de la suspensión celular al final de la incubación, mientras que el denominador es la DO del tiempo inicial.

### 4.2 Resistencia a sales biliares

Las cepas se inocularon al 3 % p/v en tubos con caldo 5 mM de ácido taurodeoxicólico (ATDC) o ácido deoxicólico (ADC). Los mismos se incubaron en estufa a 37°C durante 24 hs. Finalizado este tiempo, se midió la absorbancia a 560 nm. Los resultados fueron expresados como porcentajes de supervivencia.

## 5 Actividad antimicrobiana

Se evaluó la capacidad de las cepas de inhibir al patógeno *Escherichia coli* (aislado clínico realizado en el laboratorio de la Bioquímica Mariela Romero). Los cultivos o/n de cada cepa se centrifugaron a 6000 rpm durante 6 minutos. Los sobrenadantes se vertieron en pocillos realizados en placas con agar Mueller Hinton, sembradas en césped con la cepa de *E. coli*. Las mismas se incubaron durante 24 hs a 37°C. Al finalizar la incubación, se midieron los diámetros de los halos observados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Aislamiento e identificación fenotípica*

A partir de las tres muestras de queso procesadas se obtuvieron recuentos de 4,50 log de UFC/mL, 9,20 log UFC/mL y 9,80 log UFC/mL. En las placas de agar MRS, se observaron colonias cuyos tamaños fueron de 1 a 2 mm, de color blanco cremoso, con forma redonda, puntiformes, bordes enteros, y superficie convexa, características compatibles con colonias de BAL. A partir de allí, un total de 50 colonias se recuperaron en caldo MRS y se nombraron como CB (1-50). Con respecto a la morfología microscópica, 36 de ellas se identificaron como cocos mientras que las 18 restantes correspondieron a bacilos de distintos tamaños. En la figura 1 se muestran microfotografías de la tinción de Gram de dos de las cepas aisladas (CB3 y CB16).

Finalmente, 14 colonias completamente puras, se seleccionaron para los ensayos posteriores, de las cuales 11 corresponden a bacilos y tres a cocos.



Figura 1. Tinción de Gram de las cepas CB3 y CB16

### *Evaluación funcional de las cepas aisladas*

En las figuras 2 y 3 se muestran los valores de pH y crecimiento en leche a las 24 h de fermentación, respectivamente, mientras que los datos de acidez titulable se muestran en la tabla 1. En general, se observa que las 14 cepas evaluadas fueron capaces de crecer y acidificar la leche. La cepa CB14 fue la que presentó mayor crecimiento con un valor de 9,09 log UFC/mL, seguidas de CB4, CB13 y CB18. Respecto a la capacidad acidificante, el delta de pH (diferencia

entre el pH inicial y final) estuvo en un rango de 0,57 y 1,51 unidades de pH. La cepa CB9 fue la más acidificante, alcanzando un valor de pH de 4,55, a las 24 h de incubación, respecto del valor de 6,5 inicial. Este valor coincide con su mayor capacidad de producción de ácido láctico que alcanzó un valor de 0,40 mg/mL de muestra.

Además, todas las cepas evaluadas mostraron actividad proteolítica luego de 24 h de incubación. La concentración de aminoácidos inicial en las leches fue de 0,02 mg/, mientras que luego de 24 hs de fermentación, se situó en un rango comprendido entre 0,05 y 6,08 mg/mL. La cepa con mayor actividad proteolítica fue CB3. En este sentido, es importante destacar que la habilidad de las BAL para desarrollarse en leche, depende de su sistema proteolítico, que les permite liberar los aminoácidos esenciales para su crecimiento (Seddik, 2017).

Tabla 1. Resultados de los ensayos de acidez titulable y actividad proteolítica

Cepas	Acidez titulable (ácido láctico producido en mg/mL)	Actividad proteolítica (aminoácidos liberados en mg/mL)
CB1	0,18 ± 0,007	3,45 ± 0,39
CB3	0,17 ± 0,007	7,23 ± 0,01
CB4	0,22 ± 0,000	2,74 ± 0,13
CB6	0,29 ± 0,014	1,66 ± 0,06
CB8	0,34 ± 0,021	1,75 ± 0,03
CB9	0,40 ± 0,014	7,01 ± 0,11
CB11	0,28 ± 0,007	5,08 ± 0,13
CB12	0,20 ± 0,007	2,73 ± 0,04
CB13	0,40 ± 0,021	6,08 ± 0,02
CB14	0,26 ± 0,014	1,36 ± 0,22
CB15	0,26 ± 0,021	0,05 ± 0,04
CB16	0,24 ± 0,007	0,48 ± 0,19
CB17	0,24 ± 0,000	5,87 ± 0,07
CB18	0,24 ± 0,007	4,63 ± 0,03

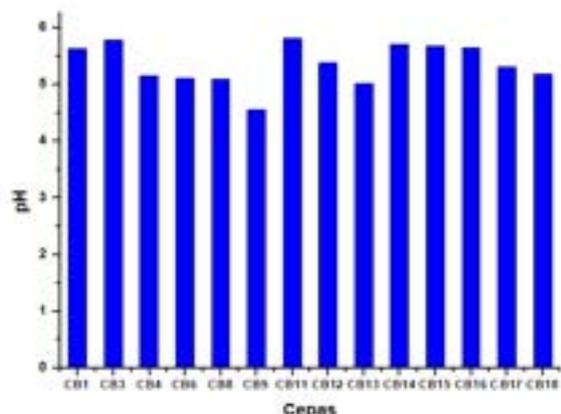


Figura 2. Valores de pH en leche luego de 24 hs de fermentación. El pH inicial de la leche fue de 6,5.

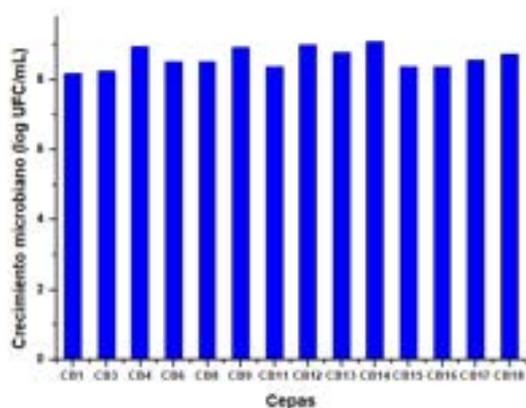


Figura 3. Crecimiento en leche luego de 24 hs de fermentación. El inóculo inicial para todas las cepas fue de 7 log UFC/ml.

*Resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal y potencial actividad antimicrobiana*

En la figura 4, se muestran los porcentajes de sobrevivencia al estrés ácido de las cepas lácticas aisladas a 1,5 y 3 h de incubación. Se observa que las 14 cepas mostraron porcentajes de sobrevivencia superiores al 93 % luego de 3 h de incubación, mientras que las cepas CB11, CB12, CB14 y CB16, no fueron afectadas por el bajo pH. Estos valores indican que las BAL autóctonas pueden sortear adecuadamente una de las principales barreras del tracto gastrointestinal (Fiocco 2019).

La figura 5 muestra los porcentajes de sobrevivencia de las cepas expuestas a 5 mM ATDC y ADC. De las 14 cepas bajo estudio, 12 mostraron porcentajes de supervivencia superiores al 75% con ATDC. Sólo las cepas CB10 y CB15, alcanzaron valores moderados entre el 50 y 70 % en presencia del ácido biliar conjugado.

El ADC mostró efectos más deletéreos sobre todas

las cepas evaluadas. En efecto, sólo las cepas CB1, CB4 y CB12 alcanzaron tasas de supervivencia del 70%, mientras que en las restantes cepas evaluadas se observaron valores en un rango comprendido entre 38 a 67 %. Estos datos, coinciden con reportes de numerosos autores, quienes informan que la resistencia a AB es dependiente de la cepa bajo estudio, así como del ácido biliar empleado, siendo el ADC el compuesto más tóxico (revisados en Bustos, 2018).

En relación a la capacidad antimicrobiana, las cepas CB11, CB12 y CB13 mostraron capacidad de inhibir el crecimiento de *E. coli* observándose el mayor halo de inhibición (1,5 cm) con CB12. Se requieren más estudios para determinar la naturaleza de los metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana.

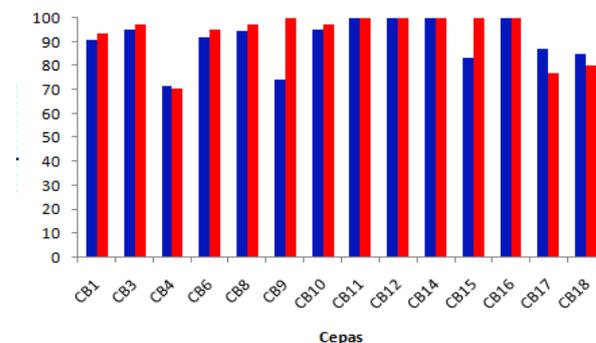


Figura 4. Porcentajes de sobrevivencia al estrés ácido. Las barras azules representan el tratamiento durante 1,5 hs de incubación y las de color rojo hasta las 3 hs.

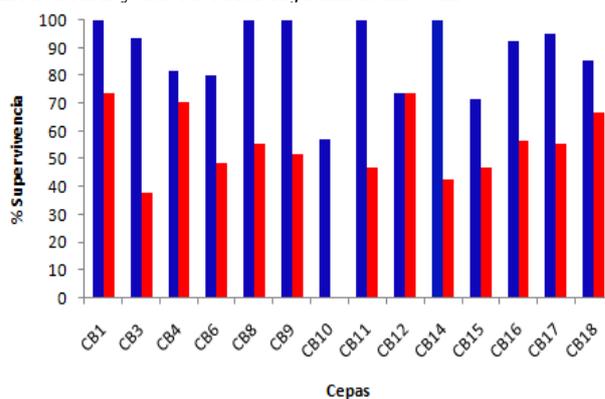


Figura 5. Porcentajes de sobrevivencia a los ácidos biliares. Las barras azules representan la supervivencia a ATDC, mientras que las rojas a ADC.

CONCLUSIONES

Las 14 cepas aisladas de quesos de leche de cabra regionales presentaron actividad proteolítica, altos porcentajes de supervivencia al estrés ácido y a la presencia de ácidos biliares especialmente a ATDC,

por lo que podrían ser empleadas en el diseño de alimentos fermentados.

*cheese lipolysis*. Journal of Dairy Science, 97, 11, 6737-6744. 2014.

## REFERENCIAS

Bustos A., Gerez C., Font de Valdez G., Taranto M. *New insights in the bacterial bile resistance mechanisms: the role of bile salt hydrolase and its impact on human health*. Food Research Int 112: 250–262. 2018.

Fiocco D., Longo A., Arena M., Russo P., Spano G., Capozzi V. *How probiotics face food stress: They get by with a Little help*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 1040-8398. 2019

Font de Valdez G. y Martos, G. I. *Biodiversidad de bacterias lácticas: conservación ex situ de cepas autóctonas argentinas*. Agrociencia, (9): 431-434. 2005.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G., Merenstein, D., Pot, B., Morelli, L., Berni, R., Flint, H., Salminen, S., Calder, P., Sanders, M. *The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic*. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 11, (8): 506-514. 2014.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS). *Consulta de expertos FAO/OMS sobre la Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los alimentos, incluida la leche en polvo con bacterias del ácido láctico vivas*. Probióticos en los alimentos: propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación, 85: 1-29. 2001.

Pavunc, A., Beganovi J., Kos B., Uroic K., Blazic M. y Suskovic J. *Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production*. Food Technology and Biotechnology, 50 (2), 141– 151. 2012.

Seddik, H., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., Drider, D. *Lactobacillus plantarum and its probiotic and food potentialities*. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 9, 111-122. 2017.

Speranza, B., Bevilacqua, A., Corbo, M., Altieri, C. y Sinigaglia, M. *Selection of autochthonous strains as promising starter cultures for Fior di Latte, a traditional cheese of southern Italy*, Journal of Science and Food Agriculture, 95, 88–97. 2015.

Torres M., Mancheño J., de las Rivas B., Muñoz R. *Production and characterization of a tributyrin esterase from Lactobacillus plantarum suitable for*