

BIODIVERSIDAD DE BACTERIAS LÁCTICAS: CONSERVACIÓN *ex situ* DE CEPAS AUTÓCTONAS ARGENTINAS

Font de Valdez, G.¹; Martos, G.I.

RESUMEN

Las colecciones de cultivo de investigación permiten resguardar la biodiversidad microbiana en todas sus formas. La colección del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), es altamente especializada y única en su tipo en Latinoamérica. Alberga 1.270 cepas de bacterias lácticas de las cuales 1.160 son cepas silvestres de diversos orígenes: alimentos de elaboración artesanal como quesos, chacinados, encurtidos, etc; ecosistemas caprinos, bovinos y buvalinos; plantas familiares de elaboración de subproductos lácteos; suelos y pasturas de altura; vegetales, etc, provenientes de regiones del NOA. La caracterización taxonómica y tecnológica de las cepas, así como los estudios sobre sus potencialidades probióticas y la búsqueda de condiciones apropiadas para su conservación a largo plazo, ha dado lugar a diferentes programas de investigación. Los resultados obtenidos evidencian la biodiversidad de este grupo de microorganismos y avalan el posible uso de las cepas en industrias de diversa índole.

PALABRAS CLAVES: bacterias lácticas, biodiversidad, conservación.

SUMMARY

LACTIC ACID BACTERIA DIVERSITY: PRESERVATION *ex situ* OF NATIVE ARGENTINIAN STRAINS

Research culture collections preserve microbial biosiversity. CERELA's culture collection (Centro de Referencia para Lactobacilos) is highly specific and unique in the subject at least in South America. It holds 1.270 lactic acid bacteria strains, most of them (1.160) are mainly wild type, isolated from different sources and substrates: home made dairy products, pickles, cured sausage; caprine, bovine and bubaline ecosystems; soil and flora in highland areas; vegetables, etc., which in turn come from NOA regions of the country. The taxonomical and technological characterization of the strains, their potential use as probiotic and studies on long term preservation of lactic acid bacteria conducted to different research programs. Lactic acid bacteria biodiversity is evident from the results and make possible the use of them in different industries.

KEY WORDS: lactic acid bacteria, biodiversity, preservation.

El término "bacterias lácticas" (BAL) describe un amplio grupo de microorganismos en forma de cocos y bacilos, Gram-positivos, no esporulados, anaeróbicos o microaerófilicos, usualmente inmóviles, catalasa-negativo, nitrato-reductasa-negativo que fermentan los carbohidratos con formación de ácido láctico como principal producto final.

Las BAL son exigentes en su nutrición y requieren medios complejos para crecer, ricos en carbohidratos, aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleico, vitaminas y oligoelementos, y una baja tensión de oxígeno. Sin embargo, tienen una gran capacidad de adaptación a condiciones ambientales diversas lo que favorece su am-

plia diseminación en la naturaleza y en nichos diferenciados (leche y lácteos fermentados, carnes y chacinados, vegetales, ensilados, masa panaria, tracto intestinal y mucosas del hombre y animales, bebidas, entre otros). Esta adaptabilidad y la producción de lactato son aprovechadas por la industria en la elaboración de diversos alimentos fermentados.

La denominación "bacterias lácticas" pone énfasis en el aspecto comercial de su metabolismo. En los alimentos, contribuyen al sabor y textura de los productos fermentados e inhiben el crecimiento de bacterias no deseadas por la producción de grandes cantidades de ácido láctico y, en algunos casos, de sustancias inhibitorias (bacteriocinas).

¹CERELA -Centro de Referencia para Lactobacilos- Chacabuco 145 (4000) San Miguel de Tucumán. Argentina.

Son reconocidas por su empleo como cultivos iniciadores (fermentos) en la manufactura de productos lácteos tales como yogur, leches ácidas, quesos pasta dura (Cheddar, Provolone, Romano, Edam), quesos pasta blanda (Brie & Camembert) (Jay M.J., 1986; Daly C., 1998) y también en el procesamiento de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales. Estos productos incluyen embutidos, vinos, cervezas, pickles, etc. Si bien constituyen un grupo bacteriano benéfico, algunas BAL son reconocidas como contaminantes de alimentos procesados (Cai Y., 1998).

Muchas BAL ejercen un impacto positivo en la salud del hombre y de animales estimulando su uso como probiótico (Rolfe, R.Z., 2000). Sin embargo, con menos frecuencia también pueden actuar como patógenos oportunistas (Struve J., 1988; Aguirre M., 1993). De allí la importancia de aplicar adecuados Criterios de Selección de cepas.

En las últimas décadas, el auge en el uso de cepas lácticas, tanto en emprendimientos industriales como en el área de salud, puso en evidencia la necesidad de conservar los recursos genéticos y la biodiversidad de este grupo. La colección de cultivos de CERELA, única en su género, surge en respuesta a esta necesidad y reúne un total de 1.270 cepas de BAL y géneros relacionados como *Bifidobacterium* y *Propionibacterium*, en un 90% aisladas por los diferentes grupos de investigación del Centro, partir de diversos nichos ecológicos argentinos a lo largo de 30 años de trabajo. La caracterización taxonómica y tecnológica de las cepas, así como los estudios sobre sus potencialidades probióticas y la búsqueda de condiciones apropiadas para su conservación a largo plazo, ha dado lugar a diferentes programas de investigación. Los resultados obtenidos permitieron configurar un Catálogo de la Colección, la cual se define como una "colección mixta" ya que si bien se originó como un cepario de investigación, brinda servicios al sector público y privado.

El valor de la Colección aumenta y se enriquece con la contribución de las distintas líneas de investigación. La caracterización y optimización de las propiedades tecnológicas de cepas para su aplicación en procesos industriales incluyen estudios metabólicos, fisiológicos, genéticos y moleculares. Actualmente la colección está estudiada en ca. 40%, y los resultados obtenidos avalan la transferencia de tecnología al sector socio-productivo y el posible uso de las cepas en industrias de diversa índole. Los aspectos más relevantes estudiados, ejemplos de biodiversidad, se detallan a continuación:

Producción de exopolisacáridos (EPS). Es una característica deseable en cepas BAL que se incluyen en cultivos iniciadores, starters, para la elaboración de leches fermentadas y quesos blandos porque estos biopolímeros mejoran la viscosidad y la textura de la matriz y, consecuentemente

disminuye la sinéresis (exudación de suero) (Low, 1998). Se analizaron 200 cepas de BAL aisladas de productos lácteos y se estudió la producción de EPS. Del total, sólo un 18% produjo EPS mucilaginoso y de éstas, un 8% fue capsular. La formación de biopolímeros está influenciada por varios factores extrínsecos como la fuente de carbono (Mozzi, F.1995), la temperatura o el pH del medio de cultivo (Mozzi, F., 1995b). La formación de EPS en BAL sería una estrategia de supervivencia en condiciones ambientales adversas (Torino, M.I., 2001).

Actividad proteolítica. Algunas enzimas de BAL liberan péptidos bioactivos al actuar sobre un sustrato proteico, los cuales tienen efecto benéfico, por ejemplo, acción hipotensora, anti-oxidante o son estimulantes del sistema inmunológico. En otros casos, el sistema proteolítico de las BAL se usa para acelerar la maduración de quesos o en la generación de productos de aroma. Estudios del sistema proteolítico de *Enterococcus faecium* (120 cepas) aislados de quesos artesanales tucumanos de alta montaña indicaron una gran variabilidad.

Reducción de alérgenos y factores antinutricionales en alimentos. Cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus* (30% de 250 cepas) aisladas de masa panaria obtenida por fermentación natural utilizaron gluten como única fuente de nitrógeno en medio de cultivo. Esta propiedad podría usarse para reducir ciertos componentes alérgenos derivados de gluten, como la gliadina, la cual estaría involucrada en la enfermedad celíaca.

El elevado contenido de alfa-D-galactosil oligosacáridos -factor antinutricional causante de flatulencia- en alimentos de soja, como rafinosa y estaquiosa, limita su consumo en Occidente. Una solución potencial es el uso de cepas BAL con buena actividad α -galactosidasa. La Figura 1 resume los resultados encontrados en distintas especies y cepas demostrando una producción variable de la enzima (Garro, M.S., 2004).

Producción de bacteriocinas y ácidos orgánicos con efecto antifúngico. Una propiedad poco común en BAL es la capacidad de producir bacteriocina, péptidos

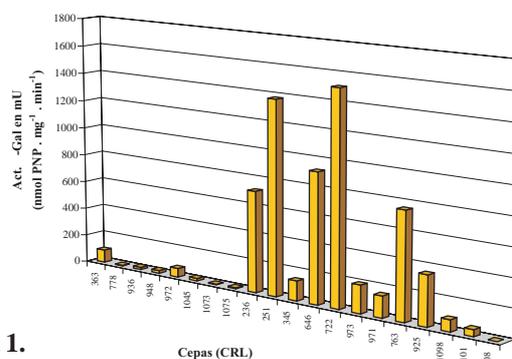


Figura 1.

antimicrobianos de bajo peso molecular. Un escaso porcentaje (6%) de un total de 530 cepas ensayadas, aisladas de distintos nichos ecológicos como alimentos (chacinados y quesos artesanales), vagina humana y cavidad oral, presentaron esta característica. Resultados negativos se obtuvieron en este último caso.

Producción de nutraceuticos. Las BAL requieren diversas vitaminas para crecer. Sin embargo, algunas cepas son capaces de producir algunas vitaminas del grupo B (ácido fólico y riboflavina). En trabajos recientes, Taranto, M.P. y col. (2003) encontraron una cepa de *Lactobacillus reuteri* productora de compuestos tipo cobalamina (vitamina B12). Actualmente, se realizan estudios de caracterización del compuesto y análisis bioquímicos y genéticos de las rutas metabólicas para optimizar su producción.

Enzimas de interés en bioprocesos. Se han encarado estudios de diversas enzimas tales como el sistema proteolítico (proteasas y peptidasas) de BAL de masas fermentadas y evaluando su capacidad de hidrolizar fitatos, principal factor antinutricional presente en alimentos de cereales y vegetales; hidrolasas de sales biliares; amilasas; *proteínas*, ej. proteasas y peptidasas en la producción de quesos; lipasas, etc.

Biodiversidad de propiedades probióticas. La selección de BAL como probióticos en alimentos tiene en cuenta la resistencia de las mismas a las condiciones y enzimas del tracto gastrointestinal como lisozima, pepsina, tripsina, acidez y sales biliares, además de propiedades benéficas intrínsecas de la cepa y sus propiedades tecnológicas. Una de las especies más utilizadas en este contexto es *L. acidophilus*. La Figura 2 muestra un estudio de las propiedades tecnológicas y probióticas de cepas de *L. acidophilus* aisladas de distintas fuentes tales como ensilado, intestino humano y leche (Lorca, G. 2001).

Un efecto probiótico importante es la capacidad de algunas cepas BAL de reducir colesterol. Ensayos en modelo animal murino (ratones Suizo-Albino) mostraron que la

administración oral de bajas dosis de *L. reuteri* permite reducir (28%) el colesterol total y LDL-colesterol en ratones hipercolesterolémicos. La ingesta del probiótico produce además, un aumento de HDL-colesterol, efecto terapéutico importante de aplicación farmacéutica (Taranto, M.P. 1998; Taranto, M.P., 2000).

Mediante el uso de modelos experimentales similares utilizando ratones BALB/c, se logró seleccionar cepas BAL con efecto inmunomodulador y estimulación de formación de inmunoglobulinas (IgA e IgG secretorias) en el sistema inmune asociado a mucosa. Se estudiaron las relaciones entre el consumo continuado de leches fermentadas con ciertas cepas (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*), la producción de citoquinas en intestino y sitios mucosos distantes (bronquios, glándulas mamarias) y de IgA, así como la viabilidad de las cepas probióticas, la participación del nicho ecológico en la estimulación del sistema inmune y la interacción de las BAL con las células inmunes (Perdigón, G., 2002).

Estudios de conservación *ex situ*

El uso de las BAL a escala industrial, tanto cultivos iniciadores como probióticos, depende en gran medida de las técnicas de conservación que deben garantizar la estabilidad de las células en términos de viabilidad y actividad. Los procesos de manufactura y almacenamiento de los alimentos someten a las BAL a situaciones de estrés tales como congelamiento, secado, baja a_w , acidez, bajas temperaturas y altas concentraciones de sales, entre otras (Bunthof y col. 1999). En el ámbito de la Colección se han estandarizado diferentes técnicas de conservación a largo (congelamiento, liofilización), mediano y corto plazo (enfriamiento) para garantizar la actividad de los cultivos. Especial atención se dispuso a especies particularmente sensibles como *L. acidophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Un adecuado conocimiento de la fisiología celular permite generar "estrategias de supervivencia" lo que puede lograrse a partir del control de factores ambientales como la temperatura de crecimiento y el pH. Estas estrategias, entre otras, son la síntesis de proteínas de estrés (CAPs, *Cold Acclimation Proteins*) y el aumento de ácidos grasos poliinsaturados (Fernandez Murga, M.L., 2000; Lorca, G., 1999).

En el ámbito del proceso de conservación, es importante contar con una buena cantidad de biomasa activa, la selección del medio de suspensión y los agentes crioprotectores (Font de Valdez, G., 1983). Entre estos últimos, glutamato de sodio al 5% en leche descremada reconstituida permite obtener buenos resultados durante el proceso de liofilización y posterior vida de estante de la mayoría de especies de BAL, incluyendo *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Martos, G.I., 1999).

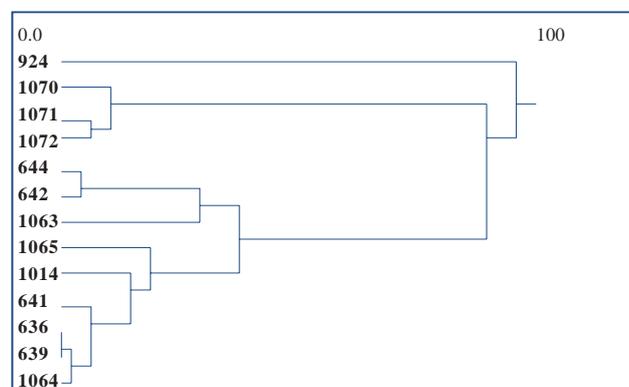


Figura 2. Dendrograma.

CONCLUSIONES

La conservación *ex situ* de BAL es un compromiso y un desafío para preservar la biodiversidad del grupo. La mayoría de las propiedades tecnológicas y probióticas de BAL de aplicación en la industria de alimentos y farmacéutica es cepa-dependiente, lo que avala los estudios realizados y refleja la importancia de preservar y mantener las colecciones de cultivo, apoyando la búsqueda de nuevos especímenes y los estudios de conservación de microorganismos.

AGRADECIMIENTOS

A todos los investigadores de CERELA cuyos resultados se incluyen. A CONICET, ANPCyT y CIUNT por los subsidios recibidos que permitieron solventar parcialmente las investigaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- AGUIRRE, M. & COLLINS, M.D. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 95-107.
- BUNTHOF, C.J.; VAN DEN BRAAK, S.; BREEUWER, P.; ROMBOUTS, F.M. & ABEE, T. 1999. Rapid fluorescence assesment on the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (8) 3681-3689.
- CAI, Y.; BENNO, Y.; TAKEDA, A.; YOSHIDA, T.; ITAYS, T. & NAKASE, T. 1998. Characterization of *Leuconostoc* species isolated from vacuum-packaged ham. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44:153-159.
- FERNANDEZ MURGA, M.L.; CABRERA, G.; FONT DE VALDEZ, G.; DISALVO, A. & SELDES, A.M. 2000. Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Microbiology* 88, 342-348.
- FONT DE VALDEZ, G.; SAVOY DE GIORI, G.; RUIZ HOLGADO, A.P. & OLIVER, G. 1983. Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze-drying. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 302-304.
- GARRO, M.S. FONT DE VALDEZ & G. SAVOY DE GIORI, G. 2004. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. *Food Microbiology* 21: 511-518.
- JAY, M.J. 1986. *Modern Food Microbiology. Fermented Foods and Related Products of Fermentation.* 239-255 and 362-406. 3th ed. Van Nostrand Reinhold Company. New York.
- LORCA, G.L. & FONT DE VALDEZ, G. 1999. The effect of suboptimal growth temperature and growth phase on resistance of *Lactobacillus acidophilus* to environmental stress. *Cryobiology* 39: 144-149.
- LORCA, G.L. 2001. Estrategias de supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* en condiciones de estres. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Tucumán. Facultad de Bioquímica.
- LOW, D.; AHLGREN, J.A.; HORNE, D.; McMAHON, D.J.; OBERG, C.J. & BROADBENT, J.R. 1998. Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolisaccharide in cheese water retention. *App. Env. Microbiol.* 64 (7) 2147-2151.
- MARTOS, G.I.; RUIZ HOLGADO, A.P.; OLIVER, G. & FONT DE VALDEZ, G. 1999. Use of conductimetry to evaluate *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* subjected to freeze-drying. *Milchwissenschaft* 54 (3): 128-130.
- MOZZI, F.; SAVOY DE GIORI, G.; OLIVER, G. & FONT DE VALDEZ, G. 1995a. Exopolisaccharide production by *Lactobacillus casei*. Influence of the carbon sources. *Milchwissenschaft* 50 (6), 307-309.
- MOZZI, F.; SAVOY DE GIORI, G.; OLIVER, G. & FONT DE VALDEZ, G. 1995b. Influence of temperature on the production of exopolisaccharide by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft* 50 (2) 80-82.
- PERDIGÓN, G.; MALDONADO GALEANO, C.; VALDEZ, J.C. & MEDICI, M. 2002. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *European J. of Clinical Nutrition* 56 (4): 521-526.
- ROLFE, R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition* 130 (2S Suppl.), 396S-402S.
- ROLLAN, G.; DE ANGELIS, M.; GOBETTI, M. FONT and DE VALDEZ, G. 2005. Proteolytic activity and reduction of gliadin-like fractions by sourdough lactobacilli. *J.App. Microbiology* (en prensa).
- SCHILLINGER, U. & LÜCKE, F.K. 1987. Identification of *Lactobacilli* from meat and meat products. *J. Food Microbiol.* 4: 199-208.
- STRUVE, J.; WEILAND, O. & NORD, C.E. 1988. *Lactobacillus plantarum* endocarditis in a patient with benign monoclonal gammopathy. *J. Infection* 17:127-130.
- TARANTO, M. P.; MEDICI, M.; PERDIGÓN, G.; RUÍZ HOLGADO, A. P. & VALDEZ, G. F. 1998. "Evidence of Hypocholesterolemic Effect of *Lactobacillus reuteri* in Hypercholesterolemic Mice". *Journal of Dairy Science.* 81: 2336-2340.
- TARANTO, M. P.; MEDICI, M.; PERDIGÓN, G.; RUÍZ HOLGADO, A. P. & VALDEZ, G. F. 2000. "Effect of *Lactobacillus reuteri* on the Prevention of Hypercholesterolemia in Mice", *Journal of Dairy Science.* 83: 401-403.
- TARANTO, M.P.; VERA, J.L.; HUGENHOLTZ, J.; FONT de VALDEZ, G. & SESMA, F. 2003. *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 produces cobalamines. *Journal of Bacteriology* 185 (18) 5643-5647.
- TORINO, M.I.; TARANTO, M.P.; SESMA, F. & FONT de VALDEZ, G. 2001. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC15807 in response to environmental pH. *Journal of Applied Microbiology* 91: 846-852.