

## Determinación de los parámetros de inactivación térmica de *Lactobacillus* spp. mediante aplicación del método de distribución de Weibull

## Determination of heat-induced inactivation parameters of *Lactobacillus* spp. by application of the Weibull distribution method

M.T. Gómez-Hernández\*, A. López-Gómez, G.B. Martínez-Hernández

Grupo de Ingeniería del Frío y de la Seguridad Alimentaria, Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

\*migueltoomas.gomez@upct.es

### Resumen

El estudio de las propiedades beneficiosas de los microorganismos probióticos no viables (paraprobióticos) se encuentra en auge tanto en el ámbito de la industria alimentaria como en el de la salud humana, por las prometedoras ventajas que presentan a nivel industrial y a nivel clínico. Para obtener microorganismos no viables que retengan dichas propiedades, es necesario determinar las condiciones de inactivación que permitan optimizar este procedimiento. En este ensayo estudiamos el proceso de inactivación mediante tratamiento térmico de dos cepas de *Lactobacillus rhamnosus* y *L. acidophilus* crecidas en condiciones de fermentación. A 75°C ambos microorganismos probióticos pudieron ser inactivados completamente en periodos cortos de tiempo (8-10 min), siguiendo un modelo de distribución de Weibull, y cuyos parámetros pueden ser optimizados para ser escalados a su producción industrial.

**Palabras clave:** Paraprobióticos; bacterias ácido-lácticas; análisis de supervivencia; respuesta térmica.

### Abstract

The assessment of the beneficial properties of non-viable probiotic microorganisms (paraprobiotics) is a growing topic in both food industry and human health, due to their promising prospects both at an industrial and at a clinical level. To obtain non-viable microorganisms retaining said properties, it is paramount to determine the inactivation conditions that allow for an optimization of this process. In this study we evaluated the inactivation process via thermal treatment of two strains of *Lactobacillus rhamnosus* y *L. acidophilus* cultured in fermenting conditions. At 75 °C, both probiotic strains could be completely inactivated within short time periods (8-10 min), fitting a Weibull distribution model, and whose parameters may be suitable for optimization upon escalation to industrial production of the non-viable microorganisms.

**Keywords:** Paraprobiotics, lactic acid bacteria; survival analysis; heat response.

## 1. INTRODUCCIÓN

Se define a los probióticos como microorganismos vivos que proporcionan un beneficio en la salud de aquel que los ingiere cuando son administrados en las cantidades adecuadas. De entre los microorganismos con propiedades probióticas más estudiadas destacan las bacterias ácido-

lácticas, y más concretamente las pertenecientes al género *Lactobacillus* spp. (1). Los mecanismos con los que los probióticos interactúan con la flora intestinal, si bien se han descrito ampliamente, siguen sin estar completamente dilucidados(2), y pueden incluso no requerir de viabilidad. En consecuencia, un enfoque de estudio se centra en los paraprobióticos, que se definen como células microbianas no viables, intactas o lisadas, que cuando son administradas en cantidades adecuadas contribuyen a un efecto beneficioso en la salud del consumidor (3). El interés de su utilización de reside en dos importantes ventajas sobre sus homólogos vivos. Tecnológicamente son más estables y seguros en la producción industrial, ya que interactúan en menor medida con otros componentes y no requieren de condiciones muy controladas para su conservación (4). Clínicamente, suponen una alternativa más segura para su administración en personas cuyo sistema inmune se encuentre comprometido, lo que minimiza riesgos de reacciones adversas (5). Para obtener estos paraprobióticos se debe someter a los probióticos vivos a un tratamiento que los inactive pero que a la vez consiga conservar las propiedades benignas de estos (4,6), no obstante los parámetros específicos varían según la cepa probiótica y la propiedad beneficiosa, por lo que es clave optimizar los procedimientos.

Así pues, el objetivo de este estudio se centra en determinar estas condiciones de inactivación mediante tratamiento térmico de dos cepas de bacterias ácido-lácticas comerciales crecidas en condiciones de fermentación, y mediante la modelización de los datos obtenidos usando el método de distribución de Weibull (7), establecer unos parámetros que permitan optimizar estas condiciones de inactivación.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Preparación de las muestras

Se emplearon cultivos liofilizados de los microorganismos probióticos *Lactocaseibacillus rhamnosus* (cepa 278 de la Colección Española de Células Tipo (CECT)), y *Lactobacillus acidophilus* (cepa DSM 24936, adquirido a un proveedor especializado (Origgio, Italia) a través de la empresa Martínez Nieto, S.A. (Cartagena, España)). Un inóculo de 0,5 g de cada uno de ellos se activó en tubos de ensayo con caldo MRS (Condalab, España) Estos tubos de ensayo fueron incubados durante 20 h en estufa a 37 °C. Cada uno de los inóculos activados fue incorporado en botellas de 1 L de leche desnatada en polvo obtenida en supermercado local (Cartagena, España), previamente reconstituida al 8% en peso en agua destilada y esterilizada mediante autoclave a 121 °C y presión de 1 bar por encima de la presión atmosférica durante 5 min. Las muestras inoculadas se incubaron durante 20 h a 37 °C en un agitador orbital (IVYMEN, Comecta, Barcelona, España) programado a 160 rpm.

### 2.2 Tratamiento térmico de las muestras

Se distribuyeron alícuotas de 100 mL en bolsas estériles de polietileno tipo Stomacher™ (Seward, Reino Unido) termoselladas en condiciones de esterilidad. Las bolsas se dispusieron sumergidas en un baño estático termostatizado (JP Selecta, España) a una temperatura programada. Se realizaron tratamientos térmicos a 70 °C, 75 °C y 80 °C por triplicado. Las muestras se fueron extrayendo de forma sucesiva tras un determinado periodo de tratamiento y se fueron sembrando de forma acorde en placas de MRS agar que se incubaron durante 48 h a 37 °C.

### 2.3 Análisis de los datos

Los datos experimentales de supervivencia fueron modelizados mediante distribución de Weibull usando para ello el complemento Excel *Solver*, de acuerdo con la ecuación (Ec.) 1 mediante regresión no lineal (7):

$$\log \frac{N}{N_0} = - \left( \frac{t}{\delta} \right)^p \quad (\text{Ec. 1})$$

donde  $N$  representa el número de células supervivientes tras un tratamiento de tiempo  $t$ ,  $N_0$  representa el recuento inicial de células vivas,  $\delta$  es el tiempo de primera reducción decimal (el tiempo en que la población de células supervivientes pasa de  $N_0$  a  $N_0/10$ ), y  $p$  es un parámetro de la curva de supervivencia que define su concavidad o convexidad.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se muestra en las Figuras 1 y 2, podemos describir el proceso de inactivación tanto de *L. rhamnosus* como de *L. acidophilus* crecidos en condiciones de fermentación mediante una distribución de Weibull con un buen ajuste de la raíz de la desviación cuadrática media (RDCM). Así pues, a concentraciones iniciales de 8 log UFC/mL ambos requieren de periodos cortos de inactivación a 70 °C, siendo estos inferiores a los 12 min para *L. rhamnosus* ( $\delta_{70}=3.013$  min) y a 18 min para *L. acidophilus* ( $\delta_{70}=8.119$ ).

El aumento de temperatura disminuye el tiempo de inactivación necesario para conseguir la inactivación completa de ambos microorganismos. Observamos que el efecto del aumento de temperatura en el tratamiento es significativamente mayor para *L. acidophilus* en comparación con *L. rhamnosus* (Tabla 1). De hecho, el tratamiento térmico de *L. acidophilus* a 80 °C presentó una notable alteración en la integridad del medio de fermentación empleado, lo cual puede tener un impacto negativo sobre el proceso de inactivación, por lo que estos resultados fueron descartados; no así para *L. rhamnosus* crecido y tratado en iguales condiciones.

Estos valores están en consonancia con lo descrito en la literatura para estos lactobacilos en los que la inactivación constituye metodología de trabajo para posteriores estudios. En concreto, Toki *et al.* (8) describieron la inactivación completa de *L. rhamnosus* GG tras 20 min a 70 °C, mientras que Ding *et al.* (9) reportaron este hecho para *L. acidophilus* ATCC 4356 tras 30 min a 65 °C. No obstante, destacamos que en la literatura estos tratamientos fueron realizados sobre microorganismos crecidos medios de cultivo selectivos como MRS en lugar de en leche.

### 4. CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos, podemos concluir que el procedimiento de inactivación de los lactobacilos seleccionados puede llevarse a cabo en periodos cortos de tiempo a temperaturas en torno a los 75 °C sin que se produzca alteración sobre el medio de crecimiento, e inferir que el proceso se ajusta al método de distribución de Weibull. No obstante, los resultados aquí presentes obtenidos a escala de laboratorio deben ser validados mediante pruebas más exhaustivas y con volúmenes más cercanos a los utilizados en las producciones industriales para tratar de optimizar este procedimiento.

### 5. AGRADECIMIENTOS

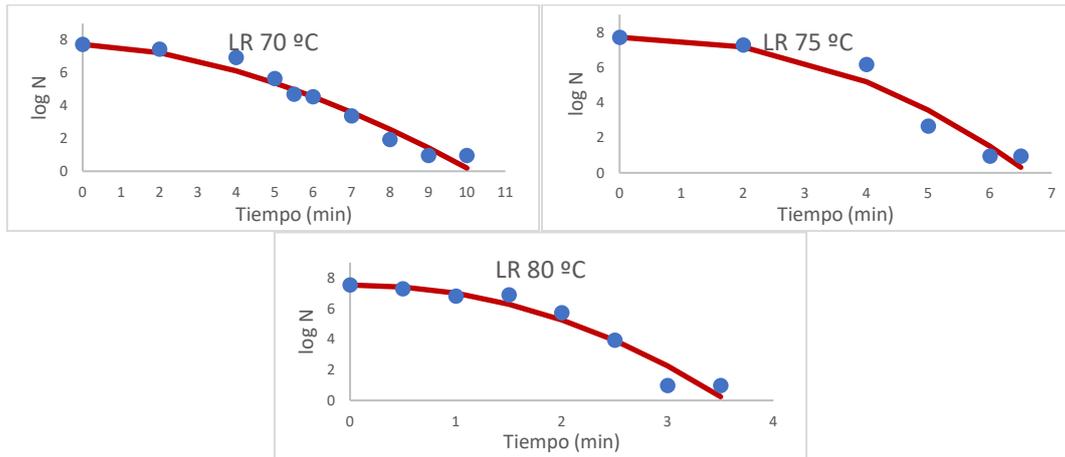
Los autores desean agradecer a la empresa Martínez Nieto, S.A. su apoyo y financiación a través del Proyecto CDTI IDI-20211211, donde se enmarcan estas investigaciones.

### 6. REFERENCIAS

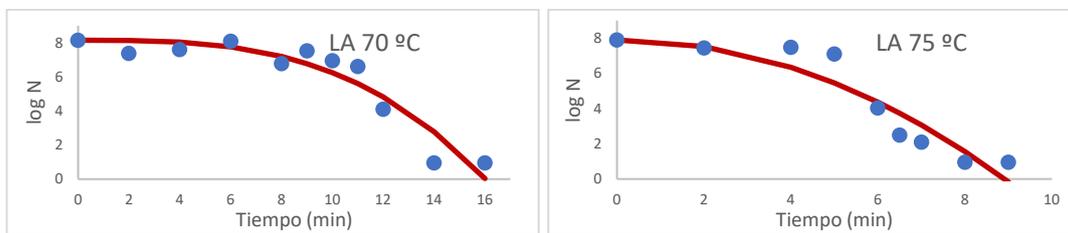
1. Goldstein EJC, Tyrrell KL, Citron DM. Lactobacillus species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. Clin Infect Dis. 2015;60(Suppl 2):S98-107.
2. Cunningham M, Azcarate-Peril MA, Barnard A, Benoit V, Grimaldi R, Guyonnet D, et al. Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. Trends Microbiol [Internet]. 2021;29(8):667-85.
3. Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept). Genes Nutr. 2011;6(3):261-74.
4. Barros CP, Guimarães JT, Esmerino EA, Duarte MCK, Silva MC, Silva R, et al. Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. Curr Opin Food Sci. 2020;32:1-8.
5. Oggioni MR, Pozzi G, Galieni P, Valensin PE, Bigazzi C. Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of Bacillus subtilis [2]. J Clin Microbiol. 1998;36(1):325-6.
6. de Almada CN, Almada CN, Martinez RCR, Sant'Ana AS. Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify

biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. Trends Food Sci Technol [Internet]. 2016;58:96–114.

7. Mafart P, Couvert O, Gaillard S, Leguerinel I. On calculating sterility in thermal preservation methods : Application of the Weibull frequency distribution model. Acta Hort. 2001;566:107–14.
8. Toki S, Kagaya S, Shinohara M, Wakiguchi H, Matsumoto T, Takahata Y, et al. Lactobacillus rhamnosus GG and Lactobacillus casei suppress Escherichia coli-induced chemokine expression in intestinal epithelial cells. Int Arch Allergy Immunol. 2008;148(1):45–58.
9. Ding Q, Sun X, Cao S, Zhao C, Wang Y, Wang X. Heat-killed Lactobacillus acidophilus mediates Fusobacterium nucleatum induced pro-inflammatory responses in epithelial cells. FEMS Microbiol Lett. 2021;368(5):1–8.



**Figura 1.** Inactivación térmica de *L. rhamnosus* CECT 278 a 70, 75 y 80 °C. Los puntos azules representan los datos experimentales, mientras que las líneas rojas expresan los modelos de inactivación mediante distribución de Weibull. N = Unidades Formadoras de Colonias/mL.



**Figura 2.** Inactivación térmica de *L. acidophilus* DSM 24936 a 70 y 75 °C. Los puntos azules representan los datos experimentales, mientras que las líneas rojas expresan los modelos de inactivación mediante distribución de Weibull. N = Unidades Formadoras de Colonias/mL.

**Tabla 1.** Valores estimados del modelo de distribución de Weibull para *L. rhamnosus* CECT 278 y *L. acidophilus* DSM 24936, obtenidos mediante inactivación térmica.

Cepa	Temperatura (°C)	Valor $\delta$ (min)	log valor $\delta$	$p$	RDCM	Valor $z$ (°C)
<i>L. rhamnosus</i> CECT 278	70	3.013	0.479	1.684	0.455	28.61
	75	2.632	0.420	2.213	0.652	
	80	1.347	0.129	2.081	0.591	
<i>L. acidophilus</i> DSM 24936	70	8.119	0.910	3.087	0.843	12.47
	75	3.226	0.509	2.034	0.955	