



# Revista Iberoamericana de Micología

www.elsevier.es/reviberoammicol



## Nota

## Estudios de la viabilidad y la vitalidad frente al congelado de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*: efecto del precondicionamiento fisiológico

Silvina Pardo <sup>a</sup>, Miguel Ángel Galvagno <sup>a,b</sup> y Patricia Cerrutti <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Microbiología Industrial, Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

<sup>b</sup>IIB- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 17 de febrero de 2008

Aceptado el 3 de julio de 2008

#### Palabras clave:

Probióticos

*Saccharomyces boulardii*

Fermentación

Congelado

Acondicionamiento fisiológico

Viabilidad-vitalidad

### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la vitalidad y la viabilidad de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* después de su congelación y descongelación, y el efecto del precondicionamiento fisiológico sobre dichas propiedades. Los resultados indican que la velocidad específica de crecimiento ( $0,3 \text{ h}^{-1}$ ) y la biomasa ( $2-3 \times 10^8$  células/ml) de *S. boulardii* obtenida en frascos agitados tanto a 28 como a 37 °C fueron semejantes. El cultivo de esta levadura en biorreactores en lote, utilizando glucosa o melaza de caña de azúcar como fuente de carbono, alcanzó rendimientos de 0,28 g de biomasa/g azúcar consumida tras 10 h de cultivo a 28 °C, obteniéndose resultados similares en fermentaciones en lote alimentado. Además, en los cultivos en lote, la vitalidad de las células en fase de crecimiento exponencial fue mayor que la de las células en fase estacionaria. En cambio, en el lote alimentado, la vitalidad de las células fue semejante a la del lote en fase estacionaria. La supervivencia a la congelación a -20 °C y posterior descongelación de las células de fermentaciones en lote en fase de crecimiento exponencial fue del 0,31% y la de fase estacionaria del 11,5%. El pretratamiento de esta levadura en medios de actividad de agua ( $a_w$ ) 0,98 aumentó 10 veces la supervivencia al congelado de las células almacenadas a -20 °C durante 2 meses. La exposición de las levaduras a medios de  $a_w$  reducida y/o el proceso de congelación/descongelación afectaron negativamente la vitalidad celular. Se concluye que condiciones de estrés como las estudiadas en este trabajo disminuyen la vitalidad de *S. boulardii*. Además, la cepa estudiada presentó buena tolerancia a las sales biliares aun a bajos valores de pH del cultivo.

© 2008 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Studies of viability and vitality after freezing of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*: physiological preconditioning effect

#### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the vitality and viability of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* after freezing/thawing and the physiological preconditioning effect on these properties. The results indicate that the specific growth rate ( $0,3/\text{h}^{-1}$ ) and biomass ( $2-3 \times 10^8$  cells/ml) of *S. boulardii* obtained in flasks shaken at 28 °C and at 37 °C were similar. Batch cultures of the yeast in bioreactors using glucose or sugar-cane molasses as carbon sources, reached yields of 0.28 g biomass/g sugar consumed, after 10 h incubation at 28 °C; the same results were obtained in fed batch fermentations. On the other hand, in batch cultures, the vitality of cells recovered during the exponential growth phase was greater than the vitality of cells from the stationary phase of growth. Vitality of cells from fed-batch fermentations was similar to that of stationary growing cells from batch fermentations. Survival to freezing at -20 °C and subsequent thawing of cells from batch cultures was 0.31% for cells in exponential phase of growth and 11.5% for cells in stationary phase. Pre-treatment of this yeast in media with water activity ( $a_w$ ) 0.98 increased the survival to freezing of *S. boulardii* cells stored at -20 °C for 2 months by 10 fold. Exposure of the yeast to media of reduced  $a_w$  and/or freezing/thawing process negatively affected cell vitality. It was concluded that stress conditions studied herein decrease vitality of *S. boulardii*. Besides, the yeast strain studied presented good tolerance to bile salts even at low pH values.

© 2008 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

#### Keywords:

Probiotics

*Saccharomyces boulardii*

Fermentation

Freezing

Physiological conditioning

Viability-vitality

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cerrutti@di.fcen.uba.ar (P. Cerrutti).

Los probióticos son cultivos microbianos vivos y activos que resultan beneficiosos para la salud humana cuando se ingieren en concentraciones adecuadas (aproximadamente  $10^9$ - $10^{10}$  microorganismos/día)<sup>11,18</sup>. La mayor parte de los probióticos comercializados para consumo humano son bacterias lácticas<sup>13,25,28</sup>. Sin embargo, el consumo de microorganismos probióticos eucariontes como las levaduras puede presentar interesantes ventajas. Por un lado, resultan resistentes a antibióticos normalmente suministrados en casos de infecciones bacterianas entéricas<sup>4,9,22</sup>; por otro, la producción industrial de probióticos debe cuidar que las tecnologías de procesamiento empleadas garanticen la estabilidad de éstos, tanto en términos de viabilidad (capacidad de reproducirse) como de actividad durante la vida útil<sup>5</sup>. Las levaduras presentan, en general, mayor resistencia a cambios ambientales bruscos (gradientes de pH, cambios osmóticos, etc.) que las bacterias lácticas, así como menores requerimientos nutricionales que redundan en la reducción de costes en los procesos de producción. Además, la mayor ácido-tolerancia de los hongos respecto de las bacterias resulta una ventaja importante, tanto en las fermentaciones (ya que disminuye el riesgo de contaminación bacteriana), como en la calidad probiótica del producto obtenido. Todos estos factores resultarían beneficiosos durante la etapa de producción, así como durante el almacenamiento y consumo<sup>19,21,23,29</sup>.

En la bibliografía clínica, se describe desde hace ya muchos años una levadura probiótica con propiedades bioterapéuticas comprobadas, identificada como *Saccharomyces boulardii*. Con esta denominación se expenden distintos productos comerciales, aunque varios estudios taxonómicos señalan que dicha levadura debería considerarse como una variedad de la especie *Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*)<sup>22,32</sup>.

Actualmente, la levadura probiótica *S. boulardii* se comercializa como un producto liofilizado. Como dicho proceso involucra la congelación, puede verse afectada la supervivencia así como la calidad probiótica del producto. Cuando se efectúa un congelado rápido de células suspendidas en medios acuosos, el medio extracelular se congela antes que el intracelular debido a la menor osmolaridad del primero. Como consecuencia de esto, el medio extracelular se concentra mientras que el intracelular se sobreenfía. Esto produce un estrés hiperosmótico que puede inducir la salida de agua intracelular al medio externo o bien el congelamiento del medio intracelular. En condiciones de congelado lento también se produce la migración de agua intracelular<sup>31</sup>. En ambos casos, se produce un estrés hiperosmótico debido a la disminución del agua libre disponible, y las células ponen en marcha mecanismos para contrarrestar este desequilibrio. La acumulación de solutos compatibles es uno de los mecanismos que pueden implementar las células osmóticamente estresadas, así como también pueden hacerlo durante los procesos de secado<sup>24</sup>.

Por otra parte, se ha encontrado que factores como la concentración celular inicial de los cultivos<sup>8</sup>, los medios y condiciones de crecimiento, el medio de secado, así como las condiciones de rehidratación y almacenamiento pueden afectar la viabilidad de bacterias lácticas probióticas liofilizadas<sup>5</sup>.

La existencia de mecanismos comunes de respuesta y protección a estrés ha sido extensamente expuesta en la bibliografía<sup>17,20</sup>. Así, se ha verificado que la exposición previa a un único estrés aplicado en forma subletal puede estimular la protección contra una nueva aplicación letal de dicho estrés o la de otros estreses de diferente naturaleza. Estos fenómenos se denominan de "protección cruzada" y confieren a los microorganismos tolerancia hacia un amplio espectro de situaciones ambientales desfavorables. En el caso de los cultivos probióticos pueden estimular respuestas adaptadas a las condiciones que enfrentarán durante el procesamiento industrial y el tránsito gástrico que, de otro modo, podrían resultarles letales<sup>2,30</sup>.

Otro parámetro indicativo de la calidad de las levaduras es su vitalidad, que se puede asociar a la capacidad de comportarse eficientemente al ser utilizadas en los productos comerciales y que puede evaluarse mediante la estimación de su actividad metabólica, siendo

esta función de la cepa y de su historia previa. Para efectuar dicha estimación, resulta de utilidad el método de "poder de acidificación", que consiste sencillamente en la medición del cambio de pH extracelular debido al metabolismo celular al suspender las levaduras en agua pura y tras agregar glucosa. Así se reflejan las reservas de energía endógena y la actividad glucolítica de las células<sup>27</sup>.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de biomasa de *S. boulardii* y el mantenimiento de sus propiedades probióticas después de ser sometida a un proceso de congelado, así como la influencia del precondicionamiento fisiológico en la calidad del producto obtenido.

## Material y métodos

**Microorganismo.** La cepa de *S. boulardii* utilizada en todos los ensayos se obtuvo a partir de un producto comercial (Floratil® Merck Química Argentina SAIC) de venta local, y se conservó en estrías a temperatura de refrigeración.

**Medios utilizados.** Se utilizó agar Sabouraud (4% de glucosa) para el mantenimiento de las cepas y agar Sabouraud con 0,2% de extracto de levadura (SABE) para el recuento de microorganismos viables.

En las fermentaciones se utilizaron los siguientes medios: ELP (composición/100 ml): extracto de levadura (Britania, Argentina) 0,5 g; peptona de carne (Britania) 0,5 g; glucosa anhidra (Biopack, Argentina) 4,0 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Mallinckrodt, USA) 0,3 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Mallinckrodt) 0,3 g. ELPNG: medio ELP sin glucosa. ELPm: se preparó reemplazando la glucosa del medio ELP por melaza de caña de azúcar (60% de azúcares reductores fermentables, según información del proveedor) con el fin de alcanzar una concentración en el medio de propagación del 4% de azúcares reductores fermentables.

**Recuento de microorganismos.** Concentración de levaduras viables: a partir de alícuotas de las muestras a estudiar, se realizaron diluciones sucesivas en agua peptonada (solución acuosa de peptona de carne al 0,1%). Se sembraron por triplicado 20 µl de cada dilución en placas de SABE. Las placas se incubaron a 28 °C durante 72 h. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml).

Concentración de levaduras totales: se determinó mediante la medición de la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro Metrolab 330 (Technique SRL, Argentina) a una longitud de onda de 630 nm o por recuento microscópico en cámara de Neubauer.

La biomasa celular se estimó mediante la determinación del peso seco por secado en estufa de vacío a 105 °C.

**Producción de biomasa.** Preparación de los inóculos: las células de levadura mantenidas en estrías se sembraron en caldo ELP y se incubaron a 28 °C con agitación orbital (250 rpm) durante 36 h.

Fermentación en frascos: se inocularon 50 ml de medio ELP contenidos en frascos Erlenmeyer de 250 ml, obteniéndose una concentración inicial de  $10^7$  células de levadura/ml. Los frascos se incubaron con agitación orbital (250 rpm) a temperaturas de 28 o 37 °C.

Fermentaciones por lote en biorreactores: se inocularon 3 l de medio ELP o ELPm contenidos en fermentadores New Brunswick Serie FS300 (New Brunswick Scientific Co., USA) de 4 l de capacidad (concentración inicial:  $10^6$  células de levadura/ml), agitados por paletas (250 rpm) y aireados ( $36 \text{ l}_{\text{aire}}/\text{h}$ ), incubándose a temperatura de  $28 \pm 1$  °C. Se realizaron controles en línea de pH y temperatura, y de glucosa (kit enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa) y medición de los azúcares reductores fermentables a partir de alícuotas convenientes extraídas durante la fermentación.

Fermentaciones en lote alimentado en biorreactores: se efectuó en los fermentadores de 4 l de capacidad, según el protocolo descrito por Galvagno y Cerrutti<sup>12</sup>. El mosto agregado durante la fermentación consistió en una solución de melaza diluida al 60% p/v en agua.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3419038>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3419038>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)