

## EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCION DE BIOMASA DE BACTERIAS LACTICAS UTILIZADAS COMO INOCULANTES PARA SILOS SOBRE LA RESISTENCIA A LA LIOFILIZACION

Saide Deisy Liz<sup>A,B</sup>

A. Instituto de Litología Industrial INLAIN-UNL- CONICET

B. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina

**Área:** Ingeniería

**Sub-Área:** Alimentos

**Grupo:** X

**Palabras clave:** inoculantes, liofilización, bacterias lácticas

### INTRODUCCIÓN

El ensilado es un proceso de conservación del forraje basado en una fermentación láctica del material vegetal. El silo se destina a la alimentación del ganado bovino para la producción de leche y carne. Si bien la fermentación puede tener lugar por la actividad espontánea de la microbiota salvaje presente en el material utilizado, también puede inducirse y estandarizarse mediante inoculantes, constituidos principalmente por bacterias lácticas. En Argentina, el empleo de inoculantes para silos muestra un crecimiento sostenido, aumentando cada año la tasa de productores que utilizan inoculantes en sus silos. El empleo de estos productos evita la proliferación de microorganismos indeseables (clostridios, mohos y levaduras), la producción de N-amoniaco, ácido butírico y micotoxinas, lo que redundaría en una mayor calidad del alimento y estabilidad aeróbica una vez abierto el silo. La elaboración de silos permite obtener un alimento de alto impacto nutricional y alta aceptabilidad (el ganado come algo que "le gusta") a un costo relativamente bajo, garantizando la oferta de alimento para el ganado durante todo el año (feedlot). A pesar del intenso y creciente empleo de inoculantes en base a bacterias ácido lácticas (BAL), prácticamente todos los productos disponibles en el mercado argentino provienen del exterior. En nuestro país son producidos sólo por dos empresas privadas. El presente trabajo de pasantía se enmarca en un proyecto recientemente aprobado por la ASaCTel-Santa Fe donde el grupo del INLAIN es beneficiario junto a la empresa santafesina Fragaria S.R.L.. La creciente demanda de inoculantes biológicos y el aliento a desarrollos biotecnológicos tendientes a la sustitución de importaciones dejan un amplio margen competitivo para la introducción de nuevos productos en el mercado nacional.

En este trabajo se estudió el efecto de las condiciones de producción de biomasa (composición del medio de cultivo, desarrollo en fermentador a pH libre y controlado) sobre la resistencia a la liofilización) de un grupo de bacterias lácticas (*L. plantarum* 71, *P. acidilactici* 72, *L. buchneri* 141) que con capacidad de actuar como inoculantes para silos de maíz.

Proyecto: ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCION DE BIOMASA DE CEPAS DE BACTERIAS LACTICAS UTILIZADAS COMO INOCULANTES PARA SILOS DE MAIZ PARA EL ESCALADO DE LA PRODUCCION INDUSTRIAL

Director del proyecto: Vinderola, Gabriel

Director del becario/tesista: Vinderola, Gabriel

## METODOLOGÍA

**Cepas:** se utilizaron *L. plantarum* 71, *P. acidilactici* 72, *L. buchneri* 141, pertenecientes a la colección del INLAIN y con capacidad de ser utilizadas como inoculantes para silos de maíz, según estudios previos en el INLAIN (Borgo, 2016)

### **Formulación de un medio de cultivo simplificado.**

Se determinó la capacidad de desarrollada las cepas en estudio de BAL, *L. plantarum* 71, *P. acidilactici* 72 y *L. buchneri* 141, en caldo MRS formulado a partir de ingredientes obtenidos de proveedores locales (Cicarelli, Biopack, Microquim), en versiones simplificadas en concentración de nutrientes. Cultivos activos de las cepas se centrifugaron, se lavaron (PBS), se inocularon (1% v/v) en las diferentes versiones de los medios de cultivo y se incubaron a 37°C durante 18 hs. Se determinó el número de células viables mediante recuento en superficie en agar MRS (Biokar).

### **Estudio del efecto de estrategias de fermentación sobre estabilidad a la liofilización.**

Se ensayaron dos estrategias de producción de biomasa: a pH controlado constante y a pH libre. Cultivos *overnight* de las cepas se inocularon en un fermentador Sartorius modelo Biostat A plus, utilizando 2 L de la versión del medio de cultivo determinada como más conveniente según actividad anterior. En una primera etapa, se inoculó *L.b.* 141 al 10% (v/v), y se condujo la fermentación por 8hs a pH 5,7 a 37°C, con 0,1% (v/v) de cisteína, 50 rpm. Inmediatamente se inocularon *L.p.* 71 y *P.a.* 72 (1% v/v) y se continuó la fermentación durante 10 hs más.

La biomasa fue centrifugada y resuspendida en 100 mL de solución crioprotectora (pH 8) conteniendo lactosa, glucosa, extracto de levadura, glutamato monosódico y dióxido de silicio. La suspensión celular se alicuotó en viales de vidrio (2 mL/vial) y se liofilizó (liofilizador ChristAlpha 1-4 L Dplus) durante 20 hs. Se realizaron recuentos de células viables en diferentes etapas del proceso.

Para el estudio de la producción de biomasa a pH libre, se inoculó (10% v/v) *L.b.* 141 en dos botellas de cultivo (1 L), se ajustó el pH a 6,5 y se incubó durante 8hs. Luego, se re-ajustó el pH a 6,5 y se inocularon (1% v/v) *L.p.* 71 y *P.a.* 72 al 1% (v/v). Se continuó la incubación por 10hs. La biomasa de una de las botella fue lavada con buffer PBS (pH 7,4) tres veces, mientras que de la otra botella se recuperó la biomasa por centrifugado sin lavado del pellet de células. Los pellets se resuspendieron en solución crioprotectora, a una de las suspensiones de biomasa se le ajustó el pH a 7, mientras que la otra (la cual no había sido lavada), presentó un valor de pH de 5,4.

### **Viabilidad de las cepas durante el almacenamiento.**

Los productos liofilizados fueron sometidos a un proceso de almacenamiento acelerado, incubándose a 37°C durante 4 semanas y se realizaron recuentos semanales de células viables. Asimismo para evaluar la viabilidad a largo plazo, los productos se conservaron a 5 y 25°C y se realizaron recuentos de células viables cada tres meses.

### **Resultados/conclusiones:**

Las diferentes versiones del medio de cultivo MRS que se prepararon fueron:  
M0: composición igual a MRS (Biokar).

M1: reducción del 50% de la pluripeptona.  
M2: reducción del 50% del extracto de carne.  
M3: reducción del 50% de la pluripeptona y del extracto de carne.  
M4: reducción del 50% de la pluripeptona y exclusión del extracto de carne.  
Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 1**:

Medio de cultivo	Recuento (órdenes log UFC/mL)		
	<i>L. plantarum</i> 71	<i>P. acidilactici</i> 72	<i>L. buchneri</i> 141
MRS	9,04 ± 0,13 <sup>a</sup>	8,99 ± 0,36 <sup>a</sup>	8,68 ± 0,11 <sup>a</sup>
M0	9,19 ± 0,08 <sup>a</sup>	9,12 ± 0,07 <sup>a</sup>	9,16 ± 0,11 <sup>a</sup>
M1	9,27 ± 0,16 <sup>a</sup>	9,06 ± 0,18 <sup>a</sup>	8,81 ± 0,12 <sup>a</sup>
M2	9,17 ± 0,12 <sup>a</sup>	9,09 ± 0,13 <sup>a</sup>	9,00 ± 0,13 <sup>a</sup>
M3	9,11 ± 0,13 <sup>a</sup>	9,00 ± 0,06 <sup>a</sup>	8,52 ± 0,14 <sup>a</sup>
M4	9,09 ± 0,14 <sup>a</sup>	8,81 ± 0,22 <sup>a</sup>	8,25 ± 0,10 <sup>b</sup>

**Tabla 1:** Recuento de células viables durante la fermentación en distintas condiciones de pH.<sup>a,b</sup> Valores en columnas con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Se realizó el test de Dunnet (unilateral) para determinar si la biomasa obtenida en algunas de las versiones formuladas (M0 a M4) sería menor que la obtenida en caldo MRS Biokar, observándose diferencias significativas (menores recuentos) solamente para *L. buchneri* 141 en M4. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó el medio M3 (reducción del 50% de la pluripeptona y del extracto de carne) para los ensayos posteriores.

pH de la fermentación	Cepa	Recuento (UFC/ml) a tiempo (hs)		
		0	8	18
5,7	<i>L. plantarum</i> 71	0	3 x 10 <sup>7</sup>	3 x 10 <sup>9</sup>
	<i>P. acidilactici</i> 72	0	2 x 10 <sup>7</sup>	5 x 10 <sup>9</sup>
	<i>L. buchneri</i> 141	1,8 x 10 <sup>8</sup>	1,7 x 10 <sup>9</sup>	6 x 10 <sup>9</sup>
Libre, liofilizado a pH 7	<i>L. plantarum</i> 71	0	3,4x 10 <sup>8</sup>	4 x 10 <sup>9</sup>
	<i>P. acidilactici</i> 72	0	2,1 x 10 <sup>8</sup>	1,4 x 10 <sup>9</sup>
	<i>L. buchneri</i> 141	3,5 x 10 <sup>8</sup>	1,2 x 10 <sup>9</sup>	4,3 x 10 <sup>9</sup>
Libre, liofilizado a pH 5,4	<i>L. plantarum</i> 71	0	3,4x 10 <sup>8</sup>	2,4 x 10 <sup>9</sup>
	<i>P. acidilactici</i> 72	0	2,1 x 10 <sup>8</sup>	1 x 10 <sup>9</sup>
	<i>L. buchneri</i> 141	1,8 x 10 <sup>8</sup>	5 x 10 <sup>8</sup>	3,8 x 10 <sup>9</sup>

**Tabla 2:** Recuento de células viables durante la fermentación en distintas condiciones de pH.

En ensayos previos (datos no mostrados), se observó que *L. buchneri* 141 no lograba niveles de 1x10<sup>9</sup> UFC/mL cuando la cepa era inoculada simultáneamente con las otras dos cepas. En la estrategia adoptada, se observó que las tres cepas en estudio fueron capaces de desarrollar hasta los niveles deseados (aprox. 9 órdenes log UFC/mL), independientemente de la estrategia ensayada.

Luego de recuperar la biomasa y realizar el proceso de liofilización del producto se estudió la viabilidad de las cepas almacenadas durante 28 días a 37°C, cuyos resultados se muestran en la **Tabla 3**.

pH	Cepa	Recuento (UFC/ml) a tiempo (días)				
		0	7	14	21	28
5,7	<i>L. plantarum</i> 71	$4 \times 10^{11}$	$3,5 \times 10^{11}$	$3 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{11}$	$2,2 \times 10^{10}$
	<i>P. acidilactici</i> 72	$5 \times 10^{11}$	$4,2 \times 10^{11}$	$2 \times 10^{11}$	$2 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{11}$
	<i>L. buchneri</i> 141	$3 \times 10^{11}$	$1,6 \times 10^{11}$	$2 \times 10^{11}$	$6 \times 10^{10}$	$2 \times 10^{10}$
Libre, liofilizado a pH 7	<i>L. plantarum</i> 71	$2,5 \times 10^{11}$	$2 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{11}$
	<i>P. acidilactici</i> 72	$2,3 \times 10^{11}$	$2 \times 10^{11}$	$2 \times 10^{11}$	$1,8 \times 10^{11}$	$1,4 \times 10^{11}$
	<i>L. buchneri</i> 141	$2 \times 10^{11}$	$1,7 \times 10^{11}$	$1,1 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{10}$
Libre, liofilizado a pH 5,4	<i>L. plantarum</i> 71	$1 \times 10^{11}$	$7 \times 10^{10}$	$2 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^{10}$
	<i>P. acidilactici</i> 72	$1 \times 10^{11}$	$6 \times 10^{10}$	$1 \times 10^{10}$	$1 \times 10^{10}$	$1 \times 10^{10}$
	<i>L. buchneri</i> 141	$1,2 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{11}$	$2 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{10}$

**Tabla 3:** Recuento de células viables liofilizadas y almacenadas durante 28 días a 37°C, obtenidas con diferentes estrategias de producción de biomasa (pH 5,7 constante vs. pH libre).

Se puede observar que la estrategia de fermentación/liofilización que mejor contribuye a mantener altos niveles de células viables en un almacenamiento acelerado, es la producción a pH libre, lavando el pellet celular antes de su resuspensión en solución protectora. Esto se puede deber a que el moderado stress producido por la acidez láctica durante la fermentación, induce mayor resistencia al stress tecnológico que implica el proceso de deshidratación por liofilización.

Concluimos que la estrategia tecnológica de producción simultánea de las tres cepas de bacterias lácticas bajo un régimen de pH libre, con lavado del pellet y liofilización en condiciones de neutralidad, produce un producto con alto recuento de células viables, y estable en condiciones adversas de almacenamiento.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Borgo, M.F. 2016.** Desarrollo de un inoculante para silos de maíz a partir de bacterias lácticas autóctonas secadas spray. Tesina de grado FBCB. UNL. (total de páginas: 87).
- Dunière, L., Sindou, J., Chaucheyras-Durand, F., Chevallier, I. and Thévenot-Sergenteta, D. 2013.** Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*. 182: 1–15.
- Muck, R.E. 2013.** Recent advances in silage microbiology. *Agricultural and Food Science*. 22:3-15.
- Reich, L.J. and Kung, Jr. 2010. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Animal Feed Science and Technology*. 159: 105–109.
- Santos, A.O., Ávila, C.L.S. and Schwan, R.F. 2013.** Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage. *Journal of Dairy Science*. 96:7777–7789.
- Schmidt, R.J., Hu, W., Mills, J.A. and Kung, Jr. 2009.** The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*. 92: 5005–5010.