



EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE LACTOBACILOS A FACTORES TECNOLÓGICOS DE INTERÉS PARA EL DESARROLLO DE CULTIVOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO

Ruhl, Emilia

Cátedra de Microbiología General FBCB-UNL

Director/a: Lic. Emilia Liza Hick

Codirector/a: Mag. María Celia Vaccari

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: lactobacilos, probióticos, resistencia tecnológica

INTRODUCCIÓN

Los probióticos se definen como ‘microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, otorgan beneficios a la salud del huésped’ (Hill y col., 2014). La dosis, para que los mismos ejerzan efectos positivos en el huésped, varían dependiendo de la cepa y el alimento en el cual se incorporan, pero se recomienda un nivel de 10^6 a 10^7 UFC/mL o g (Palanivelu y col., 2022). Además de demostrar el potencial probiótico o funcional de las cepas, cuando se piensa en incorporarlas a un producto, se debe tener en cuenta su capacidad de supervivencia en la matriz del mismo y su susceptibilidad a procesos tecnológicos de elaboración y almacenamiento. Por lo expuesto, en este trabajo se objetivó determinar la resistencia de cepas de lactobacilos, aisladas de fuentes no convencionales, durante el almacenamiento congelado en leche descremada y la tolerancia a la acidez en bebida de soja.

OBJETIVOS

1. Evaluar la resistencia tecnológica de cepas de lactobacilos al almacenamiento congelado.
2. Evaluar la resistencia de las cepas a la acidez.

Título del proyecto: LACTOBACILOS VAGINALES: ESTUDIO DEL POTENCIAL PROBIÓTICO Y SU UTILIZACIÓN COMO ALTERNATIVA PARA RESTAURAR EL BALANCE DE LA MICROBIOTA VAGINAL

Instrumento: CAI+D

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral

Director/a: Dra. Patricia Burns



- 2.1. Analizar la tolerancia al pH ácido en muestras de bebida de soja.
- 2.2. Determinar la viabilidad durante el almacenamiento refrigerado.

METODOLOGÍA

En ambos ensayos se trabajó con 10 cepas de lactobacilos, aisladas a partir de muestras de exudados muestras vaginales de mujeres sanas. Las mismas corresponden a las especies: *Lactobacillus gasseri* (7 cepas) y *L. crispatus* (3 cepas).

Resistencia al almacenamiento congelado.

Cultivos *overnight* de las cepas (22 hs, 37°C, anaerobiosis) en caldo MRSc (MRS + 0,1% cisteína) fueron centrifugados (4000 g, 8°C, 20 min), lavados con buffer PBS (pH 7,2), concentrados y resuspendidos en leche en polvo descremada estéril reconstituida al 20% (p/v).

Se prepararon alícuotas y se conservaron a -20 y -80°C. Se determinó la viabilidad celular mediante recuentos mensuales, en superficie, en agar MRSc (37°C, 48 hs, anaerobiosis) durante 6 meses. El ensayo se realizó por duplicado.

Se expresó la pérdida de la viabilidad celular como delta (Δ) del logaritmo de la concentración (UFC/mL), según la Ecuación 1.

Ecuación 1.

$$\Delta \log \left[\frac{UFC}{mL} \right] = \log \left[\frac{UFC}{mL} \right]_{(t=0)} - \log \left[\frac{UFC}{mL} \right]_{(t=final)}$$

Resistencia a la acidez y al almacenamiento refrigerado.

Las cepas fueron concentradas (10^8 UFC/mL) y resuspendidas en muestras de bebida de soja comercial, previamente acidificada con ácido láctico (simulación de fermentación), alcanzando un pH final de 4,60. Las muestras se almacenaron durante 1 mes a 5°C, en refrigerador. Se determinó la viabilidad de los lactobacilos a tiempo: 0, 7, 14, 21 y 28 días, mediante recuento en agar MRSc (37°C, 48 hs, anaerobiosis). El ensayo se realizó por duplicado.

Se expresó el resultado de la determinación de la viabilidad celular como promedio (\bar{x}) \pm desviación estándar (DE), en gráficas de tendencia; y la pérdida de la viabilidad celular según la Ecuación 1.

RESULTADOS

Resistencia al almacenamiento congelado.

La Tabla 1 muestra la variación de la viabilidad celular luego de 6 meses de almacenamiento a -80°C y -20°C.



Tabla 1. Pérdida de la viabilidad de los lactobacilos vaginales almacenados a -80°C Y -20°C, luego de 6 meses.

Cepa	Variación de la viabilidad de los lactobacilos ($\Delta \log \text{ UFC/mL} \pm \text{SD}$)	
	-80°C	-20°C
<i>L. gasseri</i> M5	0,14 \pm 0,37	0,88 \pm 0,14
<i>L. gasseri</i> M7	0,09 \pm 0,04	0,75 \pm 0,05
<i>L. crispatus</i> M27	0,33 \pm 0,12	1,72 \pm 0,28
<i>L. crispatus</i> M30	0,39 \pm 0,19	1,32 \pm 0,46
<i>L. crispatus</i> M32b	0,10 \pm 0,05	0,76 \pm 0,02
<i>L. gasseri</i> M43	0,10 \pm 0,07	0,75 \pm 0,07
<i>L. gasseri</i> I2	0,58 \pm 0,03	1,00 \pm 0,38
<i>L. gasseri</i> I8	0,05 \pm 0,02	0,50 \pm 0,25
<i>L. gasseri</i> I28	0,15 \pm 0,16	0,85 \pm 0,03
<i>L. gasseri</i> I30b	0,16 \pm 0,07	0,71 \pm 0,23

Tomando como referencia que una buena supervivencia tiene un $\Delta \log \text{ UFC/mL} < 1$ (Sarquis y col., 2019), la viabilidad de todas las cepas almacenadas a -80°C fue satisfactoria. La pérdida de la viabilidad osciló entre 0,05 y 0,58 log UFC/mL.

En cuanto a las cepas almacenadas a -20°C, la mayoría mostró una buena supervivencia, excepto *L. gasseri* I2, *L. crispatus* M30 y *L. crispatus* M27, con una disminución de 1,00, 1,32 y 1,72 $\Delta \log \text{ UFC/mL}$, respectivamente. La pérdida de la viabilidad de las demás cepas osciló entre 0,50 y 0,88 $\Delta \log \text{ UFC/mL}$.

Resistencia a la acidez y al almacenamiento refrigerado.

La tolerancia de las cepas resuspendidas en muestras de bebida de soja previamente acidificada fue satisfactoria, alcanzando valores cercanos a 10^8 UFC/mL (tiempo 0). La Figura 1 presenta los resultados de la supervivencia de los lactobacilos, durante 4 semanas a 5°C.

En cuanto al almacenamiento en dicha matriz, solo *L. gasseri* M43 tuvo una pérdida completa de la viabilidad luego de 28 días. Las cepas más resistentes con una reducción menor a 1,5 $\Delta \log \text{ UFC/mL}$ (Sarquis y col., 2019), como se observa en la Tabla 2, fueron *L. crispatus* M27, *L. crispatus* M30 y *L. gasseri* I28.

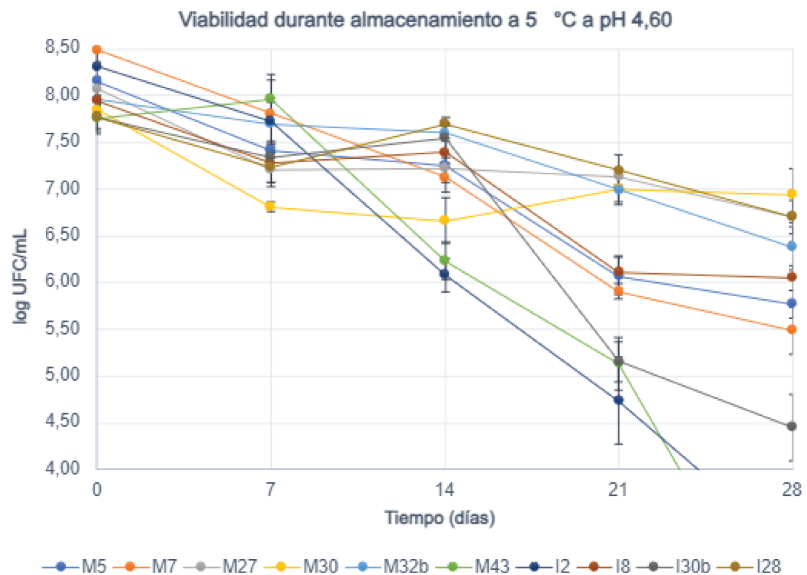


Figura 1. Resultados de la determinación de viabilidad celular de las cepas almacenadas a 5°C, en bebida acidificada (pH 4,6)

Tabla 2. Pérdida de la viabilidad de los lactobacilos vaginales almacenados a 5°C, luego de 4 semanas.

Cepa	Variación de la viabilidad de los lactobacilos ($\Delta \log \text{ UFC/mL} \pm \text{SD}$)
<i>L. gasseri</i> M5	2,39 \pm 0,12
<i>L. gasseri</i> M7	3,00 \pm 0,26
<i>L. crispatus</i> M27	1,37 \pm 0,20
<i>L. crispatus</i> M30	0,92 \pm 0,34
<i>L. crispatus</i> M32b	1,58 \pm 0,26
<i>L. gasseri</i> M43	5,91 \pm 0,07
<i>L. gasseri</i> l2	5,18 \pm 0,12
<i>L. gasseri</i> l8	1,90 \pm 0,06
<i>L. gasseri</i> l28	1,02 \pm 0,21
<i>L. gasseri</i> l30b	3,32 \pm 0,40

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que las cepas evaluadas pueden sobrevivir al almacenamiento congelado, durante 6 meses, más satisfactoriamente a -80°C que a -20°C. Esto es esperable ya que, a velocidades de congelación más lentas se forman cristales de hielo grandes que pueden dañar la integridad de las células. Las cepas más resistentes, a ambas temperaturas, resultaron ser *L. gasseri* l8, *L. gasseri* M7, *L. crispatus* M32b y *L. gasseri* M43. Como se mencionó, para la incorporación de microorganismos probióticos en alimentos, se requiere una concentración de 10^6 - 10^7 UFC/mL o UFC/g hasta su fecha de caducidad. Las cepas *L. gasseri* l8, *L. gasseri* l28, *L. crispatus* M27, *L. crispatus* M30 y *L. crispatus* M32b se mantuvieron en este rango de valores en el período de 28 días evaluado. En base a estos resultados, las cepas *L. gasseri* l8 y *L. crispatus* M32b son potenciales candidatas a ser utilizadas como probióticos, ya que ambas demostraron una buena supervivencia al almacenamiento congelado y a la acidez en bebida de soja.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Berni Canani, R., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C. & Sanders, M. E. 2014. 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, 506–514.

Palanivelu, J., Thanigaivel, S., Vickram, S., Dey, N., Mihaylova, D., & Desseva, I. 2022. Probiotics in Functional Foods: Survival Assessment and Approaches for Improved Viability. *Applied Sciences*, 12(1), 455.

Sarquis, M. A., Siroli, L., Modesto, M., Patrignani, F., Lanciotti, R., Mattarelli, P., Reinheimer, J., & Burns, P. 2019. Novel bifidobacteria strains isolated from nonconventional sources. Technological, antimicrobial and biological characterization for their use as probiotics. *Journal of applied microbiology*, 127(4), 1207–1218.

