

Viabilidad de *Lactobacillus salivarius* DSPV010P encapsulada, destinadas a pollos parrilleros, durante el almacenamiento a diferentes temperaturas

Berisvil AP¹, Zimmermann JA¹, Saluzzo M¹, Sirini, NE¹, Zbrun MV^{1,2}, Signorini ML³, Rosmini M², Soto LP^{1,2}.

¹Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Consejo Nacional del Investigaciones Científicas y Técnicas (ICIVET-CONICET). ²Departamento de Salud Pública. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL. Kreder 2805, (3080) Esperanza, Santa Fe, Argentina. ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Rafaela (CONICET-INTA) Ruta 34 Km 227, (2300) Rafaela, Santa Fe, Argentina. ayeberis@hotmail.com

El uso de los probióticos como herramienta profiláctica en sistemas de crianza intensivos de pollos parrilleros, está cobrando mayor relevancia en las últimas décadas. Éstos son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren efectos benéficos en el huésped². Los probióticos deben sobrevivir a diversos factores como el proceso de producción, las condiciones de almacenamiento y las bio-barreras del hospedador hasta llegar al intestino del mismo. Para mejorar la tasa de supervivencia de los microorganismos probióticos frente a estos factores, la encapsulación se considera una metodología prometedora. El uso de polímeros como material de pared mejora la estabilidad física y mecánica de la cápsula probiótica¹. Por otro lado, la estabilidad de los probióticos encapsulados durante el proceso de secado mediante liofilización puede ser mejorada por la adición de crioprotectores. Algunos subproductos de la industria láctea, como el permeado de suero de queso, pueden utilizarse como crioprotectores y su implementación disminuiría el costo de producción del inóculo. Para que ejerzan su efecto probiótico, se recomienda que los alimentos que contienen bacterias probióticas tengan una concentración de 10^8 – 10^9 Log UFC/g justo antes de la ingestión para asegurar que en el tracto-intestinal se logre una concentración de 10^6 – 10^7 Log UFC/g⁴ de materia fecal. El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de la cepa *L. salivarius* DSPV010P encapsulada, almacenada bajo diferentes condiciones de temperatura. La cepa *L. salivarius* DSPV010P de origen aviar, pertenece al cepario del LAA ICiVet/UNL-CONICET y fue seleccionada por su resistencia a las condiciones gastrointestinales, la hidrofobicidad de la superficie celular y la producción de compuestos antimicrobianos. Para llevar a cabo este objetivo, la cepa probiótica fue activada en placa en medio MRS (Man Rogosa and Sharpe), a 37°C por 72 h en aerobiosis. Luego se realizaron dos cultivos consecutivos en caldo MRS a 37°C durante 18 h. La biomasa de *L. salivarius* DSPV010P para su posterior encapsulación se obtuvo mediante un proceso de fermentación en biorreactor (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) con las siguientes condiciones controladas: agitación constante a 120 rpm, temperatura a 37°C y pH=6. La cepa se inoculó al 2% en permeado de suero de queso (60g/l) (Arla Foods S.A.) suplementado con sulfato de manganeso 0,003g/l; extracto de levadura 4g/l, y se incubó a 37°C durante 18 h.. Al final de la producción de biomasa el cultivo fue enfriado y luego centrifugado a 4500 g durante 10 min a 17 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con buffer PBS dos veces. Posteriormente se procedió al armado de las cápsulas mezclando el cultivo, el material de pared (almidón pre-gelificado, concentrado al 20%) y los crioprotectores (la mitad de las cápsulas contenían leche descremada 6% y la otra mitad permeado de suero de queso 6%), en una proporción de 5:1 (biomasa:materiales/crioprotectores). La mezcla de los materiales y el armado de las cápsulas se realizó en un dispositivo creado para tal fin. Las cápsulas fueron congeladas a -80°C por 18 h y luego liofilizadas durante 8h con una presión de 0.067 mbar y una temperatura de -54°C (Martin Christ ALPHA 1-4 LD plus). Luego del proceso de liofilización, las cápsulas fueron almacenadas bajo diferentes condiciones de temperatura. Un tercio de las cápsulas fueron mantenidas a 4 °C, otro tercio fueron conservadas a temperatura ambiente (TA) y el resto fueron conservadas a -20 °C. Los recuentos del número de células viables se realizó al día 0 (post-

VII JORNADA DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN

Noviembre 2019. Esperanza, Santa Fe, Argentina.

Área temática: **PRODUCCIÓN ANIMAL**

liofilización) y cada 30 días durante un período de 180 días. Para ello se sembraron diluciones decimales en solución Ringer $\frac{1}{4}$ en placas con agar MRS. Las mismas fueron incubadas a 37 °C durante 72 h en aerobiosis. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. La conservación de la viabilidad celular de las cápsulas fue evaluada mediante un diseño factorial: 1 (matriz) x 2 (crioprotectores) x 3 (temperatura) y se utilizó un ANOVA factorial de medidas repetidas y test de Duncan. En cuanto a los resultados, no se encontraron diferencias en la viabilidad celular de las cápsulas con el empleo de los crioprotectores ($P=0,469$). Cuando se analizó la interacción entre el efecto de los crioprotectores y la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad celular no se encontraron diferencias ($P=0,255$). Sin embargo, la temperatura de almacenamiento como factor principal afectó la conservación de la viabilidad celular a lo largo de los 180 días ($P<0,001$). Las cápsulas con leche descremada, mantenidas a temperatura de congelación, mantuvieron mayor viabilidad que las de TA y 4°C ($P<0,001$). Las cápsulas preservadas a -20°C presentaron una viabilidad de 9,64 Log UFC/g durante los 180 días, mientras que las cápsulas a 4°C tuvieron una viabilidad de 9,30 Log UFC/g y a TA la viabilidad fue de 4,99 Log UFC/g. Por el contrario, las cápsulas con permeado de suero de queso no presentaron diferencias entre las conservadas a temperatura de 4°C y -20°C, pero si con las almacenadas a TA ($P<0,001$). Las cápsulas preservadas a -20°C presentaron una viabilidad de 9,59 Log UFC/g, mientras que las cápsulas a 4°C tuvieron una viabilidad de 9,44 Log UFC/g y de 4,99 Log UFC/g para las de TA durante los 180 días del ensayo. Las cápsulas almacenadas a temperaturas más bajas mantuvieron mayor viabilidad. Esto podría estar relacionado con el efecto protector de las bajas temperaturas sobre la estabilidad de las células, reduciendo los efectos de los propios procesos metabólicos y reacciones químicas de los microorganismos, como la oxidación de ácidos grasos con lo cual se logra una vida útil más larga de los microorganismos en las cápsulas. Por otro lado, la mayor temperatura de conservación aumentaría la actividad celular y podría explicar la menor viabilidad de los microorganismos en las cápsulas conservadas a TA³. A través de este estudio evaluamos la viabilidad de *L. salivarius* DSPV010P encapsulada, almacenada bajo diferentes condiciones de temperatura. Luego de evaluar diferentes matrices para la conformación de las cápsulas la elección de las cápsulas con permeado de suero de queso por sobre las elaboradas con leche descremada permitiría disminuir los costos de producción de las mismas. En próximos trabajos, estas cápsulas, serán evaluadas en ensayos donde se administrarán a pollos parrilleros criados en granjas para valorar su eficiencia como vehículo de cepas probióticas.

Bibliografía

1. Shori, AB (2017). Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit. Journal of Biosciences. 1-5.
2. Nazzarro, F; Fratianni, F; Coppola, R; Sada, A; Orlando, P. (2009). Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. J Funct Foods, 319-323.
3. FAO/WHO, (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Food and agriculture organization of the United Nations and World Health Organization. Córdoba, Argentina.
4. Kanmani P. A, Satish Kumar R., Yuvaraj N., Paari K.A., Pattukumar V.A., Venkatesan Arul (2011). Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. Biochemical Engineering Journal, 58-59, 140-147