

Estrategias de producción de biomasa de inoculantes para silos de maíz en fermentador e impacto sobre la sobrevida al secado spray

Blajman, J.E.¹; Páez, R.B.²; Cuatrin, A.²; Lingua, M.S.³; Massera, A.F.²; Vinderola, G.⁴
1Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Rafaela (CONICET-INTA).

2Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Rafaela (INTA).

3Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba (ICYTAC, UNC-CONICET).

4Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET).

jblajman@yahoo.com.ar

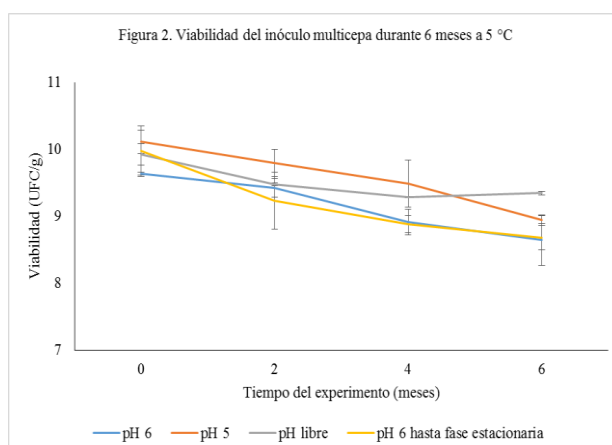
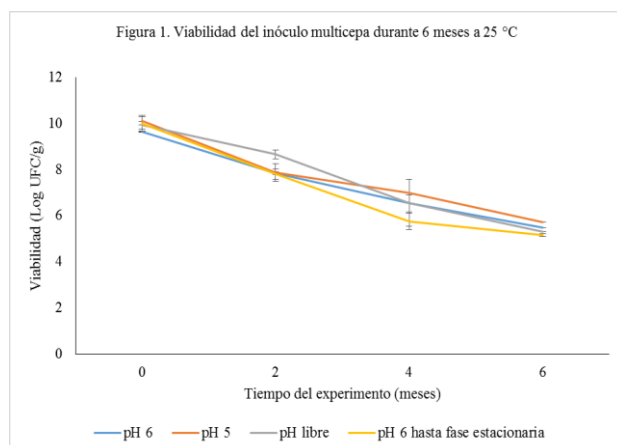
El ensilado de forrajes puede mejorarse mediante el agregado de inoculantes basados en bacterias ácido lácticas (BAL) que ayuden en los procesos fermentativos. La elaboración de silos inoculados permite obtener un alimento de alta calidad nutricional (mejorando la performance productiva de los bovinos) y mayor palatabilidad a un costo relativamente bajo, estabilizar la oferta de nutrientes durante todo el año manteniendo cargas más elevadas, y disminuir el riesgo climático de la producción de pasturas. Asimismo, permite reducir la presencia de micotoxinas, microorganismos alterantes y patógenos¹.

Diferentes estrategias de producción de biomasa de BAL pueden conducir, de forma cepa-dependiente, a obtener distintos rendimientos en la cantidad de biomasa generada; y estas estrategias podrían tener efectos en la sobrevida al proceso de deshidratación subsecuente. La producción de biomasa en fermentador de BAL puede llevarse a cabo a pH libre o a diferentes valores de pH constante. Cuando el cultivo es conducido sin control de pH, hay una exposición natural de las cepas a la acidez que ellas propias desarrollan al metabolizar la fuente carbonada para producir, principalmente, ácido láctico. La exposición a este factor de estrés puede inducir la expresión de proteínas de estrés que podrían tener un efecto protector ante otros factores estresantes (protección cruzada)³. Por otro lado, la estrategia de producir biomasa a pH cercano a la neutralidad, comparado con el cultivo a pH libre, permitiría obtener mayor cantidad de células viables². Sin embargo, estos cultivos podrían ser más susceptibles a los factores de estrés posteriores (deshidratación por ejemplo) ya que no han sido expuestos a la acidez láctica. Una estrategia combinada podría ser la producción de biomasa a pH 6 constante, seguido de una exposición a la acidez láctica. Debido a lo expuesto anteriormente, el objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de desarrollo de biomasa en fermentador de tres cepas de BAL autóctonas con potencial para formar parte de un inoculante para silos de maíz (*Lactobacillus plantarum* Hv75, *Pediococcus acidilactici* 3903 y *Lactobacillus buchneri* B463), y analizar la influencia del proceso fermentativo sobre la viabilidad posterior al secado spray.

Se utilizó una versión simplificada del medio de cultivo MRS, y se determinó la capacidad de producción de biomasa en un fermentador Sartorius biostat A plus bajo 4 regímenes: batch a pH libre, batch a pH 5 y 6 constante (control de pH con NaOH), y batch a pH 6 constante hasta fase estacionaria temprana, y luego interrupción del control de pH y acidificación natural. En todos los casos se realizaron recuentos de células viables a lo largo de la producción de biomasa. Para tal fin, se efectuaron diluciones decimales en agua de peptona 0,1% (p/v), las cuales se sembraron en superficie en agar MRS. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 72 h en aerobiosis. Con el propósito de precisar el efecto de las diferentes estrategias de producción de biomasa sobre la resistencia al secado spray y a la conservación de los polvos obtenidos, los cultivos se centrifugaron, se resuspendieron en solución de maltodextrina-wpc (10%-10% p/v) y se deshidrataron por secado spray en un mini-secadero spray BUCHI (modelo B290, Flawil, Suiza, temperatura de entrada del aire 140 °C, temperatura de salida 80 °C y flujo de aire de 601 L/h). Los cultivos deshidratados obtenidos se almacenaron en viales cerrados al vacío y se conservaron a 5 y 25 °C durante 6 meses. Los recuentos de células viables fueron realizados en agar MRS (37 °C, 72 h, aerobiosis) antes y después del secado spray y cada dos meses durante el almacenamiento. Para el recuento de células viables, los polvos se

rehidrataron al 20% (p/v) y se incubaron a 37 °C durante 15 min con agitación periódica, de modo de reconstituir el producto a las condiciones anteriores al secado spray. Las diferencias entre las medias de los datos obtenidos fueron evaluadas mediante ANOVA y Test de Comparaciones Múltiples. El nivel de significancia estadística se estableció en $p \leq 0,05$.

La producción de biomasa en fermentador de las tres cepas cocultivadas fue similar en todas las condiciones de pH evaluadas ($p=0,1101$). En relación a la supervivencia al secado spray, no hubo diferencias en el comportamiento de las cepas cocultivadas bajo diferentes condiciones de pH ($p=0,2762$). La viabilidad de las cepas durante el almacenamiento varió con la temperatura de conservación del polvo ($p<0,001$). No obstante, no se hallaron diferencias significativas ($p=0,1435$) entre las diferentes condiciones ensayadas a 25 °C y a 5 °C ($p=0,0954$) (Figura 1 y 2). Sin embargo, en el último caso, la menor viabilidad se observó cuando la estrategia fue producir biomasa a pH 6 constante (Figura 2). La resistencia cruzada, donde una condición de estrés puede hacer que las células sean resistentes a otras condiciones estresantes, es un fenómeno generalizado entre los sistemas de resistencia en BAL, aunque variable entre las especies⁴. En este trabajo, la aplicación de estrés relacionado con el crecimiento en condiciones de pH no controlado o pH bajo, resultó ser una alternativa viable para mejorar la resistencia intrínseca y aumentar la supervivencia de las BAL durante su almacenamiento a 5 °C tras el secado spray.



1. Blajman, J.E.; Páez, R.B.; Vinderola, C.G.; Lingua, M.S.; Signorini, M.L. (2018). A meta-analysis on the effectiveness of lactic acid bacteria for corn silage. *Journal of Applied Microbiology*, <https://doi.org/10.1111/jam.14084>.
2. Guyot, J.P.; Calderon, M.; Morlon-Guyot, J. (2000). Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 176-182.
3. Lavari, L.; Ianello, R.; Páez, R.B.; Zotta, T.; Cuatrin, A.L.; Reinheimer, J.; Parente, E.; Vinderola, G. (2015). Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 322-330.
4. van de Guchte, M.; Chaze, T.; Jan, G.; Mistou, M.Y. (2012). Properties of probiotic bacteria explored by proteomic approaches. *Current Opinion in Microbiology*, 15(3), 381-389.