

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^a, Miguel Ángel Galvagno^{a,b} y Patricia Cerrutti^{a,*}

^aLaboratorio de Microbiología Industrial, Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

^bIIB- 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:

Prebióticos

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 ($2\text{-}3 \times 10^8$ 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 ($2\text{-}3 \times 10^8$ 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)^{11,18}. La mayor parte de los probióticos comercializados para consumo humano son bacterias lácticas^{13,25,28}. 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^{4,9,22}; 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 útil⁵. 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^{19,21,23,29}.

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 expanden 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*)^{22,32}.

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 sobreenfría. 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 intracelular³¹. 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 secado²⁴.

Por otra parte, se ha encontrado que factores como la concentración celular inicial de los cultivos⁸, 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 liofilizadas⁵.

La existencia de mecanismos comunes de respuesta y protección a estrés ha sido extensamente expuesta en la bibliografía^{17,20}. 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^{23,30}.

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 células²⁷.

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; KH_2PO_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 l_{aire}/h), incubándose a temperatura de 28 ± 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 Cerrutti¹². El mosto agregado durante la fermentación consistió en una solución de melaza diluida al 60% p/v en agua.

El resto de las condiciones fueron las descritas para las fermentaciones en lote.

Actividad de agua (a_w). Se determinó el crecimiento de *S. boulardii* en medio ELP ($a_w = 0,99$) y en el mismo medio con a_w reducida (entre 0,99 y 0,87) y adición de NaCl (Mallinckrodt), glucosa (Biopack) o sorbitol (Mallinckrodt) en las proporciones calculadas según las isothermas obtenidas en la bibliografía^{6,10}. Después, se determinaron los valores de a_w en un equipo Aqualab Serie 3 (casa comercial, país).

Determinación de la a_w mínima de crecimiento: se inocularon 50 ml de los medios de a_w previamente establecida con el propósito de alcanzar una concentración inicial de 1×10^4 células de levadura/ml. Dichos cultivos se incubaron durante 48 h a 28 °C en forma estática efectuándose la medición de la DO y el recuento de UFC/ ml.

Ensayos de congelación/descongelación. Se congelaron alícuotas de 1 ml de los cultivos contenidas en tubos Eppendorf a -20 °C (velocidad de enfriamiento ≈ 3 °C/min) durante 20 h, seguido de descongelación en baño de agua a 25 °C (velocidad de descongelamiento ≈ 190 °C/min); luego se realizó un nuevo congelado a -20 °C durante 4 h y posterior descongelado a 25 °C. Esta metodología de congelación en 2 ciclos es una adaptación de la utilizada previamente por Lewis et al²⁰.

Congelación de células preincubadas en medio de a_w reducida. Las células de *S. boulardii* en fase estacionaria de crecimiento (48 h de incubación en medio ELP) se sometieron a un preestrés osmótico suspendiéndolas en medio ELPNG de $a_w = 0,98$ fijada por adición de sorbitol. Dichas suspensiones se incubaron a 28 °C con agitación mecánica (160 rpm) durante 2 h. Al cabo de ese tiempo, se centrifugaron las muestras y las células se resuspendieron en medio ELPNG. Luego se realizó el ensayo de congelación/descongelación de alícuotas de 1 ml contenidas en tubos Eppendorf en 2 ciclos. La evaluación de la supervivencia se realizó por duplicado en los distintos tiempos de almacenamiento durante 2 meses, por recuento en placa de células viables. Los resultados obtenidos se compararon con controles de células preincubadas en medio ELPNG de $a_w = 0,99$.

Ensayo de vitalidad-determinación del poder de acidificación (adaptación de Kara et al¹⁵). Se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 min alícuotas de 200 ml de las muestras suspendidas en el medio a estudiar (en las fases de crecimiento correspondientes a cada experimento). Posteriormente, se realizaron 2 lavados por suspensión y centrifugación con 20 ml de agua destilada a 4 °C. Los precipitados microbianos obtenidos se suspendieron en 10 ml de agua destilada fría (tiempo = 0 min), se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 min. Después se sumergieron en baño de agua a 25 °C y se agitaron magnéticamente registrándose el pH cada minuto durante 10 min. A ese tiempo se agregaron 0,5 ml de glucosa (20,2% p/v) y se continuó el registro durante 10 min más. Las mediciones de pH se realizaron con un equipo Thermo Orion 410 A (casa comercial, país).

Crecimiento en medio nutritivo con sales biliares y a pH ácido. Se preparó caldo nutritivo (Merck Química Argentina SAIC) suplementado con 0,6% de glucosa y 0,5% de sales biliares (Oxoid, Inglaterra). El pH se ajustó a 3,0 y 5,0 agregando HCl 0,1 N.

Las levaduras inoculadas ($7-8 \times 10^4$ células/ml) se incubaron durante 48 h a 28 °C.

Resultados y discusión

Producción de biomasa de *S. boulardii*. Se realizaron fermentaciones en lote y en lote alimentado con la finalidad de evaluar la cantidad y calidad de la biomasa de levadura obtenida.

En primer lugar, se determinaron las curvas de crecimiento de la levadura en medio ELP contenido en frascos Erlenmeyer incubados

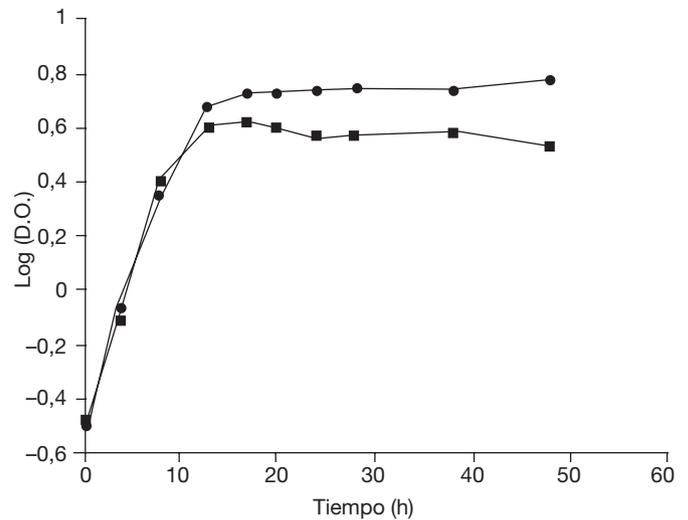


Figura 1. Curvas de crecimiento de *Saccharomyces boulardii* en frascos agitados durante 48 h a 28 °C (●) y a 37 °C (■).

Tabla 1

Valores de k (velocidad específica de crecimiento), t_d (tiempo de duplicación) y $N_{m\acute{a}x}$ (concentración celular en fase estacionaria) obtenidos en las fermentaciones para la obtención de biomasa en medio ELP

Condiciones de cultivo	k (/h) t_d (h)	$N_{m\acute{a}x}$ (células/ml)
Frascos agitados a 28 °C	$0,30 \pm 0,08 \backslash 3,0$	$2,9 \times 10^8$
Frascos agitados a 37 °C	$0,33 \pm 0,08 \backslash 3,0$	$2,0 \times 10^8$
Biorreactores a 28 °C	$0,74 \pm 0,04 \backslash 1,4$	$3,0 \times 10^8$

con agitación durante 48 h a temperaturas de 28 y 37 °C (fig. 1) con la finalidad de evaluar los parámetros cinéticos.

Aunque las temperaturas óptimas de crecimiento de las levaduras están generalmente comprendidas entre los 27 y los 32 °C, los resultados obtenidos en frascos agitados indican que la velocidad específica de crecimiento así como la biomasa producida a 28 y 37 °C fueron comparables (tabla 1), lo que, en este caso, posibilitaría efectuar la producción a 37 °C. Esto podría representar una ventaja en el caso de microorganismos probióticos en los cuales la capacidad de crecer a 37 °C constituye un importante factor de selección³². Además, garantizaría una buena producción en un rango relativamente amplio de temperaturas, aun ante eventuales incrementos térmicos durante la fermentación, lo que redundaría en un beneficio para la economía del proceso.

Posteriormente, se realizaron fermentaciones en biorreactores con medios ELP o ELPM a una temperatura de 28 °C. En la tabla 1 se muestran los valores de la velocidad específica de crecimiento en fase exponencial (k), el tiempo de duplicación (t_d) y la concentración máxima alcanzada en fase estacionaria. En los biorreactores, la trofofase finalizó al cabo de 10 h y el rendimiento obtenido, $Y_{x/g}$ (biomasa producida/glucosa consumida), fue del 27,5% al cabo de 10 h de fermentación. La productividad a dicho tiempo fue de 0,55 g/l h en medio ELP. Similares resultados se obtuvieron en medio ELPM (datos no mostrados).

La metodología de las fermentaciones en lote resultó sencilla y adecuada para la obtención de biomasa de *S. boulardii*, tanto en un medio semisintético, conteniendo glucosa como principal fuente de carbono y de energía, como en el medio conteniendo un sustrato de mucho menor coste (melaza de caña de azúcar). El empleo de materias primas y procesos económicos resulta fundamental considerando los grandes volúmenes involucrados en la producción a escala industrial.

En las condiciones ensayadas, el rendimiento fue satisfactorio teniendo en cuenta los valores hallados en la bibliografía¹. Por otra

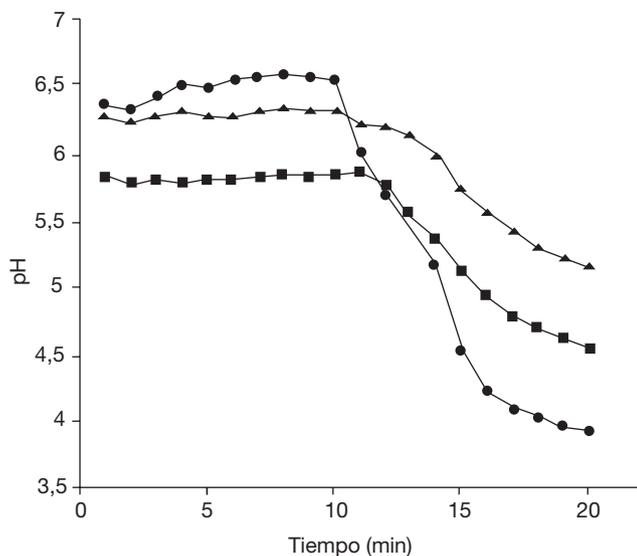


Figura 2. Test de vitalidad. Poder de acidificación (Δ pH) de las células de *Saccharomyces boulardii* obtenidas en fase exponencial (9 h) (●) y estacionaria (48 h) (■) de una fermentación en lote, y al cabo de 9 h en una fermentación en lote alimentado (▲).

Tabla 2

Porcentaje de supervivencia de células de *Saccharomyces boulardii* en fases de crecimiento exponencial y estacionaria, sometidas a 1 y 2 ciclos de congelado a -20°C

Ciclo de congelado	% S en fase exponencial	% S en fase estacionaria
Primero	1,86	12,89
Segundo	0,31	11,45

% S: $([\text{UFC/ml}] \text{ después del congelado} / [\text{UFC/ml}] \text{ antes del congelado}) \times 100$.

parte, teniendo en cuenta que la fermentación en lote alimentado requiere mayor equipamiento y un mayor control del proceso, ya que implica bombeo regulado del sustrato alimentado con el fin de regular la velocidad de alimentación de la fuente de carbono, se puede considerar que la producción de biomasa en lote presenta ventajas para su implementación a mayor escala. Además, al tratarse de un sistema cerrado, presenta menores riesgos desde el punto de vista de las contaminaciones.

Si bien los rendimientos en lote alimentado fueron similares a los obtenidos en las fermentaciones en lote, la principal diferencia entre ambos procesos de producción se observó al determinar la calidad de la levadura obtenida. Para ello, se realizaron ensayos de "poder de acidificación" tomándolo como parámetro para estimar la vitalidad celular. En la figura 2 se observan las curvas de medición de pH realizadas en muestras obtenidas en la fermentación en lote a las 9 y 48 h (fases exponencial y estacionaria, respectivamente) y al cabo de 9 h en la fermentación por lote alimentado.

En la fermentación en lote, se observa que el mayor valor de Δ pH se obtuvo para células en fase exponencial (Δ pH = 2,6), mientras que las células en fase estacionaria presentaron un Δ pH = 1,3. Las células obtenidas por fermentación en lote alimentado presentaron un Δ pH = 1,1.

Estos resultados señalan una vitalidad de las células en fase exponencial significativamente mayor respecto de las células en fase estacionaria en cultivos en lote. Por otra parte, en la fermentación en lote alimentado (en la cual se estableció como limitante la fuente de carbono aportada por la melaza de caña de azúcar), la variación del pH de la suspensión de las levaduras obtenidas fue semejante a la observada en la fase estacionaria del cultivo en lote. Se puede suponer, entonces, que la limitación en la disponibilidad de la fuente de carbono (fase estacionaria de la fermentación en lote y fermentación en lote alimentado) se traduce en una situación no ideal que afecta

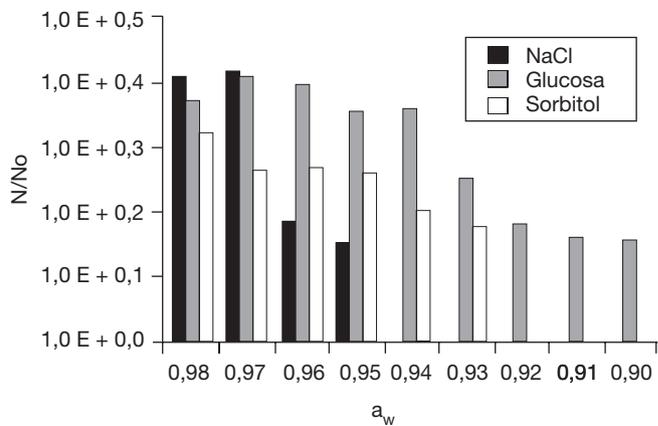


Figura 3. Efecto de la disminución de la actividad de agua en el crecimiento de *Saccharomyces boulardii* en presencia de NaCl, glucosa y sorbitol a 28°C . No: concentración inicial = 10^4 células/ml; N: células/ml al cabo de 48 h de incubación.

el estado fisiológico de las células disminuyendo la vitalidad de la levadura, cuyo efecto se evidencia en la disminución del Δ pH determinado por el ensayo del "poder de acidificación".

Procesamiento "aguas abajo". Teniendo en cuenta que *S. boulardii* se expone en forma de producto liofilizado, se evaluó el efecto de la congelación y la disminución de la a_w , ambos factores de estrés a los que se ve expuesta la levadura durante su procesamiento, sobre la viabilidad y vitalidad de la levadura.

Para ello se estudió el efecto del congelado/descongelado sobre células de levadura en distintas fases de crecimiento en lote así como el efecto de la disminución de la a_w sobre el crecimiento de *S. boulardii* en presencia de distintos solutos. Finalmente, se estudió el efecto del congelado sobre la viabilidad y vitalidad de células preincubadas en un medio de a_w reducida en condiciones preseleccionadas.

Congelación. Se estudió el efecto de 1 (20 h) y 2 (4 h más) ciclos de congelado a -20°C sobre la viabilidad de células de levadura ($7,10^5$ UFC/ml) cosechadas en fase de crecimiento exponencial y estacionaria, respectivamente. La viabilidad de las células en fase de crecimiento exponencial disminuyó en más de 2 ciclos logarítmicos después de los 2 ciclos de congelado/descongelado, mientras que en las levaduras en fase estacionaria la disminución fue inferior a 1 ciclo logarítmico. Los porcentajes de supervivencia al cabo de cada uno de los ciclos de congelación (tabla 2) reflejaron la mayor resistencia a ésta de las células en fase estacionaria respecto de las que se encontraban en fase de crecimiento exponencial. Esto coincide con lo encontrado en la bibliografía para otros microorganismos acerca de la mayor resistencia a situaciones de estrés de células en fase estacionaria respecto de células en la etapa de crecimiento activo^{3,14,16}.

Preincubación a a_w reducida y posterior congelado. En primer lugar se determinó la a_w mínima de crecimiento de *S. boulardii* cultivada en medio ELP con adición de NaCl (solute iónico), glucosa (solute no iónico metabolizable) o sorbitol (solute no iónico no metabolizable) en el rango de a_w comprendido entre 0,99 y 0,87 unidades (fig. 3). El NaCl resultó ser el soluto que inhibió el desarrollo a a_w más elevadas: sólo hubo crecimiento de aproximadamente 1,5 ciclos logarítmicos hasta $a_w = 0,95$ (8% p/p de NaCl) mientras que en presencia de glucosa y sorbitol el crecimiento se observó hasta $a_w = 0,90$ (48% p/p) y $a_w = 0,93$ (42% p/p), respectivamente. Es de notar que otras levaduras del género *Saccharomyces*²⁶, que tiene por hábitat natural los sustratos azucarados, presentaron un comportamiento similar frente a estos solutos. Por debajo de $a_w = 0,89$ (con glucosa o sorbitol) no se detectaron células viables, probablemente debido a un daño osmótico irreversible.

Basándose en estos resultados, se determinó la supervivencia a la congelación en función del tiempo de almacenamiento a -20°C

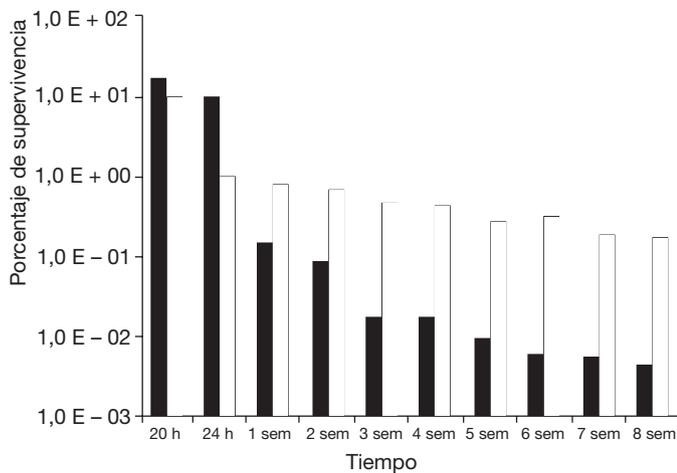


Figura 4. Supervivencia al almacenamiento a -20°C al cabo de 20, 24 h y hasta 8 semanas de congelado de células de *Saccharomyces boulardii* preincubadas durante 48 h en medio ELPNG de $a_w = 0,99$ (columnas negras) y $0,98$ (columnas blancas, sorbitol).

durante 8 semanas de células de *S. boulardii* preincubadas en medio ELPNG con adición de sorbitol a $a_w = 0,98$, con respecto a un control (ELPNG de $a_w = 0,99$) (fig. 4). En ambas condiciones se encontró un mayor descenso de la supervivencia en función del tiempo a menores tiempos de almacenamiento, mientras que a partir de la segunda-tercera semana la disminución relativa de la supervivencia evaluada al cabo de 2 ciclos de congelado fue mucho menos marcada. Al cabo de 8 semanas, la supervivencia de la levadura preincubada a $a_w = 0,98$ fue del 0,17% mientras que la del control ($a_w = 0,99$) fue del 0,04%. El efecto protector al congelado observado en las levaduras preincubadas en el medio de $a_w = 0,98$ se podría atribuir a la efectiva acumulación de sorbitol durante la preincubación previa al congelado. En cambio, las células de levadura incubadas en su ausencia no habrían sido capaces de acumular concentraciones efectivas de solutos compatibles durante el corto período que dura el proceso de congelación. Similares resultados fueron informados por Carvalho et al⁵ en bacterias lácticas sometidas a procesos de secado.

Test de vitalidad de células preincubadas a 2 niveles de a_w , antes y después del congelado. Se evaluó, además, el estado fisiológico de las células sometidas a los procesos anteriormente mencionados mediante la determinación del “poder de acidificación”.

En la figura 5 se observa que tanto la disminución de la a_w como el proceso de congelación afectaron la vitalidad de las células de *S. boulardii*, dando por resultado un menor descenso del pH extracelular. Nuevamente, se evidencia que, aunque los porcentajes de supervivencia fueron relativamente elevados, la vitalidad celular se vio afectada tras la aplicación de estos procesos. Sin embargo, las células de levadura sometidas a estos tratamientos fueron capaces de crecer aproximadamente 2 ciclos logarítmicos en un medio nutritivo que contenía sales biliares a pH 3 y 5, respectivamente (fig. 6). La tolerancia a la acidez y a las sales biliares es fundamental en el caso de microorganismos probióticos que deben atravesar el estómago y llegar vivos al intestino. Allí deben resultar resistentes a las sales biliares y ser capaces de colonizar para, finalmente, ejercer sus efectos benéficos en el huésped. Es muy importante evaluar la resistencia a la acidez y a los ácidos biliares de cada probiótico en particular, ya que las respuestas pueden variar según la especie⁷.

Conclusiones

En este trabajo se ha puesto de manifiesto que la viabilidad y la vitalidad de la levadura son parámetros independientes. Cualquier

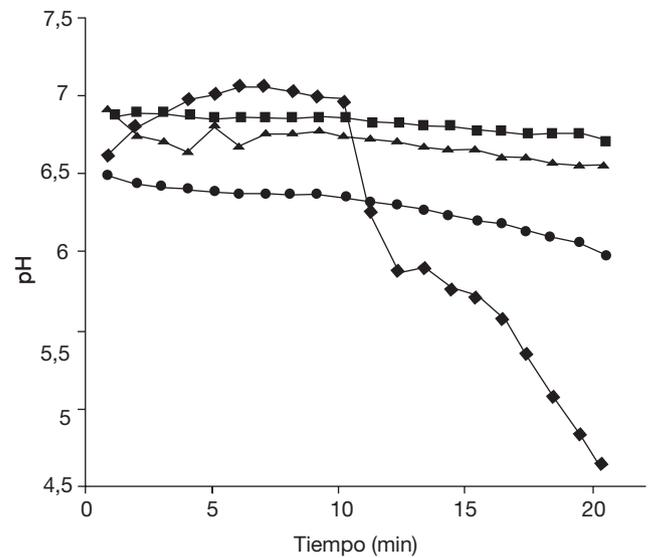


Figura 5. Test de vitalidad. Curvas de poder de acidificación (ΔpH) de células de *Saccharomyces boulardii*: antes \blacklozenge $a_w = 0,99$, ($\text{DpH} = 2,34$); \bullet $a_w = 0,98$ ($\Delta\text{pH} = 0,43$) y después de la congelación \blacktriangle $a_w = 0,99$ ($\Delta\text{pH} = 0,21$); \blacksquare $a_w = 0,98$ ($\Delta\text{pH} = 0,17$).

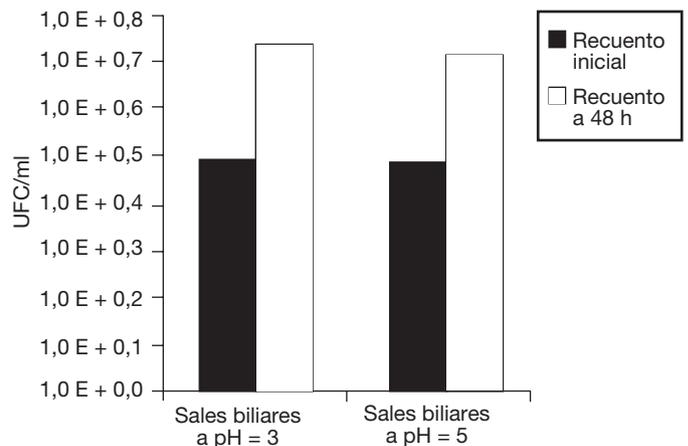


Figura 6. Crecimiento de *Saccharomyces boulardii* en presencia de sales biliares a pH 3,0 y 5,0, respectivamente: recuentos en placa de UFC/ml iniciales (columnas negras) y al cabo de 48 h de incubación (columnas blancas) a 28°C .

condición o situación que represente un estrés para la levadura (congelación, hiperosmolaridad, falta de nutrientes, presencia de metabolitos tóxicos, etc.) parece afectar la vitalidad de ésta, sin que necesariamente se produzca una disminución de la viabilidad celular. La fase estacionaria de crecimiento en una fermentación en lote se establece por falta de algún nutriente esencial, acumulación de metabolitos tóxicos o superpoblación celular, condiciones todas que corresponden a una situación no ideal que representa un estrés para la levadura. Este hecho se vio reflejado en un descenso de la vitalidad celular, estimado por una disminución del ΔpH en el ensayo de “poder de acidificación”. A pesar de que las células en fase estacionaria de crecimiento resultaron más resistentes al congelado/descongelado en términos de viabilidad, su vitalidad (ΔpH) fue menor que en las células en fase de crecimiento exponencial. Del mismo modo, los procesos de congelación o la reducción de la a_w afectaron la vitalidad de las levaduras, aunque esto no siempre redundó en un drástico descenso de la viabilidad.

Por lo tanto, la evaluación de la vitalidad sería un buen indicador de la “calidad” de la levadura, y la relación “viabilidad-vitalidad” en

función de las condiciones de proceso aplicadas se debe considerar en cada caso con el fin de suministrar a los consumidores las concentraciones efectivas necesarias para alcanzar un eficiente efecto probiótico.

Agradecimientos

Agradecemos al ingeniero Mario Kuperwaser de BPF Argentina S.A. la donación de la melaza de caña de azúcar y las determinaciones de azúcares reductores fermentables.

Bibliografía

- Acevedo CG, Romero JO, Espejo RT. Actividad de distintas presentaciones comerciales de *Saccharomyces boulardii*. Rev Chil Nutr. 2003;31:33-38.
- Attfield P. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. Nat Biotechnol. 1997;15:1351-1357.
- Biriukova EN, Medentsev AG, Arinbasarova AI, Akimenko VK. Tolerance of the yeast *Yarrowia lipolytica* to oxidative stress. Mikrobiologiya. 2006;75:293-298.
- Can M, Befirbellioglu BA, Avci IY, Beker CM, Pahsa A. Prophylactic *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a prospective study. Med Sci Mon Int Med J Exp Clin Res. 2006;12:19-22.
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Xavier Malcata F, Gibas P. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. Int Dairy J. 2004;14:835-847.
- Chirife J, Ferro Fontán C, Benmergui EA. The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. IV- a_w prediction in aqueous non-electrolyte solutions. J Food Technol. 1980;15:59-70.
- Chou LS, Weimer B. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. J Dairy Sci. 1999;82:23-31.
- Costa E, Usall J, Teixidó García N, Viñas I. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. J Appl Microbiol. 2000;89:793-800.
- Duman DG, Bor S, Ozuteniz Ö, Sahin T, Oguz D, Isikan F, et al. Efficacy and safety of *Saccharomyces boulardii* in prevention of antibiotic-associated diarrhoea due to *Helicobacter pylori* eradication. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2005;17:1357-1361.
- Ferro Fontán C, Chirife J, Benmergui EA. The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods I. Prediction in single aqueous electrolyte solutions. J Food Technol. 1979;14:625-637.
- Furrie E, Senok AC, Sullivan KE. Pondering probiotics. Clin Immunol. 2006;121:19-22.
- Galvagno M, Cerrutti P. Aumento de la actividad panificante de levaduras comerciales por aplicación de condiciones de estrés durante su propagación. Rev Arg Microbiol. 2004;36:41-46.
- Heenan CN, Adams MC, Hosken RW, Fleet GH. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. Lebensm Wiss Technol. 2004;37:461-466.
- Ishihama A. Adaptation of gene expression in stationary phase bacteria. Curr Op Gen Develop. 1997;7:582-588.
- Kara BV, Simpson WJ, Hammond JRM. Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. J Inst Brew. 1988;94:153-158.
- Khroustalyova G, Adler L, Rapoport A. Exponential growth phase cells of the osmotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* are extremely resistant to dehydration. Process Biochem. 2001;36:1163-1166.
- Komatsu Y, Kaul SC, Iwahashi H, Obuchi K. Do heat shock proteins provide protection against freezing? FEMS Microbiol Lett. 1990;60:159-162.
- Lee YK, Salminen S. The coming age of probiotics. Trends in Food Sci Technol. 1996;6:706-708.
- Leroy F, de Vuyst L. Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: a nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria. Appl Environ Microbiol. 2001;67:4407-4413.
- Lewis J, Learmonth R, Attfield P, Watson K. Stress co-tolerance and trehalose content in baking strains of *Saccharomyces cerevisiae*. J Ind Microbiol Biotechnol. 1997;18:30-36.
- Lousier V, Malfeito-Ferreira M. En: Spoilage. Yeasts in Spoilage. Amsterdam: Elsevier Science; 2003. p. 1-8.
- McCullough MJ, Clemons KV, McCusker JH, Stevens DA. Species Identification and Virulence Attributes of *Saccharomyces boulardii* (nom. inval.). J Clin Microbiol. 1998;36:2613-2617.
- Mönckeberg F. Producción microbiana industrial: fermentación. La Revolución de la Bioingeniería. Santiago de Chile: Editorial Mediterráneo; 1988.
- Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying: a review. J Microbiol Meth. 2006;66:183-193.
- Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Crit Rev Food Sci Nut. 1999;39:13-126.
- Onishi H. Osmophilic Yeasts. Adv Food Res. 1963;12:53-94.
- Opekarova M, Sigler K. Acidification power: indicator of metabolic activity and autolytic changes in *Saccharomyces cerevisiae*. Folia Microbiol. 1982;27:395-403.
- Salminen SP, Gueimonde M, Isolauri E. Probiotics that modify disease risk. J Nutr. 2005;135:1294-1298.
- Singh SK, Ahmed SU, Pandey A. Metabolic engineering approaches for lactic acid production. Process Biochem. 2006;41:991-1000.
- Stanton C, Ross PR, Fitzgerald GF, van Sinderen D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. Curr Op Biotechnol. 2005;16:198-203.
- Tanghe A, van Dijck P, Thevelein JM. Why do microorganisms have aquaporins? Trends Microbiol. 2006;14:78-85.
- van der Aa Kühle A, Skovgaard K, Jespersen L. *In vitro* screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. Int J Food Microbiol. 2004;101:29-39.