

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en
Ciencias Biológicas

**“SECADO SPRAY APLICADO AL DESARROLLO DE CULTIVOS
PROBIÓTICOS A PARTIR DE CEPAS DE LACTOBACILOS
AUTÓCTONOS”.**

Lic. Luisina Lavari

Director: Dr. Gabriel Vinderola

Co-Directora: Dra. Roxana Paez

Lugar de realización: INTA EEA Rafaela e
Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) UNL – CONICET

2016

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de Tablas.....	1
Índice de figuras	2
Abreviaturas y símbolos.	8
Agradecimientos... ..	9
Publicaciones.	10
Resumen.	13
Summary.....	18
Introducción general.	22
1- ALIMENTOS PROBIÓTICOS.	22
2. VIABILIDAD Y FUNCIONALIDAD DE BACTERIAS PROBIÓTICAS.	24
3. PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE BACTERIAS PROBIÓTICAS.	26
4- CONSERVACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS.	29
4.1. <i>Secado spray. Principios de la tecnología.</i>	30
Objetivos.....	35
OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	35
CAPITULO I: Utilización de suero de queso para la producción de biomasa y secado spray de lactobacilos probióticos.	36
1. INTRODUCCIÓN.	37
OBJETIVO.	42
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	42
2.1 <i>Cepas y condiciones de cultivo.</i>	42
2.2 <i>Desarrollo en medios de cultivos formulados y en medios lácteos.</i>	42
2.3 <i>Optimización de secado spray de suero de queso.</i>	45
2.4 <i>Secado spray de lactobacilos probióticos en suero de queso – almidón y leche descremada - almidón.</i>	47
2.5 <i>Análisis estadístico.</i>	47
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	49
3.1 <i>Desarrollo de lactobacilos probióticos en medios formulados y lácteos.</i>	49
3.2 <i>Optimización del secado spray de suero de queso – almidón.</i>	55
3.3 <i>Secado spray de lactobacilos probióticos en suero de queso - almidón.</i>	59

4. CONCLUSIONES PARCIALES.	65
CAPITULO II: Desarrollo de <i>L. rhamnosus</i> 64 en permeado de suero de queso. Efecto de la aplicación de estrés en la supervivencia al secado spray.	66
1- INTRODUCCIÓN.	67
OBJETIVO.	69
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	69
2.1 <i>Microorganismo</i>	69
2.2. <i>Medio de cultivo</i>	70
2.3. <i>Desarrollo de <i>L. rhamnosus</i> 64 en permeado de suero de queso</i>	71
2.4. <i>Cinética de crecimiento durante la fermentación a pH controlado</i>	72
2.5. <i>Efecto de la exposición a diferentes tipos de estrés en la respuesta al desafío térmico y oxidativo</i>	74
2.6. <i>Selección de la matriz para secado spray</i>	74
2.7. <i>Efecto de la aplicación de distintos tipos de estrés sobre la supervivencia al secado spray</i>	75
2.8. <i>Análisis estadístico</i>	78
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	78
3.1 <i>Producción de biomasa de <i>L. rhamnosus</i> 64 en permeado de suero</i>	78
3.2. <i>Cinética de crecimiento durante la fermentación a pH controlado</i>	85
3.3. <i>Efecto de la aplicación de estrés moderado en la supervivencia al desafío térmico y oxidativo</i>	89
3.4. <i>Cinética de inactivación por calor en células expuestas a estrés ácido moderado</i>	94
3.5. <i>Secado spray en suero de queso y estrés térmico</i>	97
4. CONCLUSIONES PARCIALES.	103
Capítulo III: Estudio de la capacidad funcional <i>in vivo</i> de <i>L. rhamnosus</i> 64 y efecto del secado spray.	104
1. INTRODUCCIÓN.	105
OBJETIVO.	108
CAPITULO III-a: Capacidad inmunomoduladora en intestino.....	109
1. INTRODUCCIÓN.	110
OBJETIVO.	112
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	112
2.1. <i>Microorganismo</i>	112
2.2. <i>Animales y alimentación</i>	112
2.3. <i>Actividad fagocítica y cuantificación de IgA secretoria en contenido intestinal</i>	113

2.4. Enumeración de células productoras de IgA.....	114
2.5 Determinación de citoquinas.....	115
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	115
3.1. Actividad fagocítica de macrófagos peritoneales.....	116
3.2 Cuantificación de IgA intestinal.....	117
3.3 Determinación de citoquinas.....	120
CONCLUSIONES PARCIALES.....	129
CAPITULO III-b: Estudio de la capacidad de protección de <i>L. rhamnosus</i> 64 en un modelo de salmonelosis.....	130
1. INTRODUCCIÓN.....	131
OBJETIVO.....	133
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	133
2.1. Microorganismos.....	133
2.2. Animales y alimentación.....	134
2.3. Análisis estadístico.....	135
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	135
4. CONCLUSIONES PARCIALES.....	137
CAPITULO III-c: Estudio de la capacidad de protección de <i>L. rhamnosus</i> 64 en un modelo de inflamación intestinal de colitis aguda.....	138
1. INTRODUCCIÓN.....	139
OBJETIVO.....	140
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	140
2.1. Microorganismo.....	140
2.2. Animales y alimentación.....	141
2.3. Inducción de colitis aguda por TNBS.....	141
2.4. Tratamiento estadístico.....	142
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	143
4. CONCLUSIONES PARCIALES.....	147
CAPÍTULO IV: Producción de <i>L. rhamnosus</i> 64 deshidratado por secado spray a escala piloto e industrial y aplicación tecnológica.....	148
INTRODUCCIÓN.....	149
OBJETIVO.....	150
CAPÍTULO IV-a: Secado spray piloto de <i>L. rhamnosus</i> 64.....	151
1. INTRODUCCIÓN.....	152
OBJETIVO.....	153

2. MATERIALES Y MÉTODOS.	154
2.1 <i>Microorganismo.</i>	154
2.2 <i>Optimización de las condiciones de secado spray para obtener la mayor supervivencia de L. rhamnosus 64.</i>	154
2.3 <i>Efecto de la aplicación de un estrés térmico moderado en el fermentador y/o en la solución de secado sobre la viabilidad.</i>	155
2.4 <i>Secado spray a escala piloto de L. rhamnosus 64.</i>	158
2.5. <i>Secado spray a escala industrial de L. rhamnosus 64.</i>	160
2.6. <i>Análisis estadístico.</i>	162
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	162
3.1. <i>Optimización de las condiciones de secado spray para obtener la mayor supervivencia de L. rhamnosus 64.</i>	162
3.2 <i>Efecto de la aplicación de un estrés térmico moderado sobre la sobrevivencia de L. rhamnosus 64 deshidratado en suero de queso – almidón.</i>	168
3.3 <i>Secado spray a escala piloto de L. rhamnosus 64.</i>	173
3.4 <i>Secado spray a escala industrial de L. rhamnosus 64.</i>	186
4. CONCLUSIONES PARCIALES	190
CAPÍTULO IV-b: Adición de L. rhamnosus 64 deshidratado por secado spray a miniquesos reducidos en materia grasa.	191
1. INTRODUCCIÓN	192
OBJETIVO.	193
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	194
2.1 <i>Producción de L. rhamnosus 64 deshidratado en suero de queso - almidón.</i>	195
2.2 <i>Elaboración de quesos blandos miniatura reducidos en materia grasa.</i>	195
2.3 <i>Evaluación de la viabilidad de L. rhamnosus 64.</i>	199
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	199
3.1 - <i>Elaboración de quesos blandos miniatura reducidos en materia grasa.</i>	199
3.2 <i>Evaluación de la viabilidad de L. rhamnosus 64.</i>	200
4. CONCLUSIONES PARCIALES.	203
Conclusiones finales.	204
Perspectivas.	206
Bibliografía	207
Anexo I: Protocolo de evaluación de microorganismos probióticos	233
Anexo II: Condiciones y resultados del modelo de Superficie de respuesta.	236

Índice de Tablas.

Tabla 1: Composición (g/100 mL) de medios de cultivo formulados para la producción de biomasa de lactobacilos probióticos.....	43
Tabla 2: Composición (g/100 mL) y pH de los subproductos lácteos utilizados.	45
Tabla 3: Diseño central compuesto utilizado para optimizar el secado spray de una solución de suero de queso – almidón.....	46
Tabla 4: Recuentos de lactobacilos probióticos (37°C, 16 h, aerobiosis) en MRS comparado con los medios formulados.....	50
Tabla 5: Recuento de células viables alcanzados por cada cepa en cada medio lácteo, comparado con caldo MRS comercial.....	52
Tabla 6: Composición (g/L) del medio de cultivo WMB.....	69
Tabla 7: Experimento factorial fraccional para la evaluación del desarrollo de <i>L. rhamnosus</i> 64 en permeado de suero de queso.....	82
Tabla 8: Estimaciones y errores estándares del modelo lineal utilizado para determinar el efecto de extracto de levadura, triptona, Na ₂ CO ₃ , Tween 80 y solución Mg-Mn, en el desarrollo de <i>L. rhamnosus</i> 64 en permeado de suero de queso.	83
Tabla 9: Ensayos confirmatorios del diseño factorial fraccional (corridas 17-24 en permeado de suero de queso.....	84
Tabla 10: Parámetros cinéticos para las fermentaciones realizadas en anaerobiosis y en aerobiosis	87
Tabla 11: Parámetros estimados del modelo de Weibull para supervivencia luego del desafío con calor u oxidativo en células de <i>L. rhamnosus</i> 64.....	95
Tabla 12: Efecto de la aplicación de un estrés térmico, ácido o la combinación de ambos sobre la sobrevivencia de <i>L. rhamnosus</i> 64 al secado spray.....	102
Tabla 13: Diseño central compuesto utilizado para optimizar la sobrevivencia al secado spray de <i>L. rhamnosus</i> 64 en una solución de suero de queso – almidón.....	155
Tabla 14: Matrices de secado utilizadas para deshidratar <i>L. rhamnosus</i> 64 en un secadero spray piloto (LABMAQ).....	158
Tabla 15: Condiciones optimizadas para el secado de suero de queso – almidón con la adición o no de <i>L. rhamnosus</i> 64.....	165

Índice de Figuras.

Figura 1: Esquema del secado spray aplicado como método de encapsulación de bacterias probióticas	32
Figura 2: Mini Spray Dryer Büchi B-290.....	40
Figura 3: Componentes del Mini Spray Dryer Büchi B-290.....	41
Figura 4: Desarrollo de <i>L. gasseri</i> 37, <i>L. paracasei</i> Jp1 y <i>L. rhamnosus</i> 64 en MRS, permeado de suero, suero de queso y suero de ricota.....	51
Figura 5: Curva de desarrollo de <i>L. rhamnosus</i> 64 en suero de queso (7% p/v), a pH 6 constante, agitación 200 rpm y con burbujeo de CO ₂	53
Figura 6: Desarrollo de <i>L. rhamnosus</i> 64 en suero de queso (7% solidos totales) a pH 6 constante, con y sin burbujeo de CO ₂	54
Figura 7: Evolución de oxígeno disuelto durante el desarrollo de <i>L. rhamnosus</i> 64 en suero de queso (7% p/v), a pH 6 constante, agitación 200 rpm sin burbujeo de CO ₂	54
Figura 8-a: Gráfico de superficie de respuesta durante el secado spray de suero de queso – almidón 20% (p/v), donde la variable respuesta es la humedad.....	58
Figura 8-b: Gráfico de superficie de respuesta durante el secado spray de suero de queso – almidón 20% (p/v), donde la variable respuesta es la temperatura de salida.....	59
Figura 9: Recuento de células viables de <i>L. gasseri</i> 37, <i>L. paracasei</i> Jp1 y <i>L. rhamnosus</i> 64 antes y después del secado spray suero de queso - almidón y leche descremada – almidón.....	60
Figura 10: Recuentos de células viables de <i>L. gasseri</i> 37, <i>L. paracasei</i> Jp1 y <i>L. rhamnosus</i> 64 en leche descremada - almidón o en suero de queso durante el almacenamiento a 5°C.....	62
Figura 11: Obtención de permeado de suero por ultrafiltración de suero de queso.....	70
Figura 12: Fermentadores 1 L, Applikon, Università degli Studi della Basilicata (Potenza, Italia).....	73
Figura 13: Aplicación de diferentes tipos de estrés a biomasa de <i>L. rhamnosus</i> 64.....	77

Figura 14: Cinéticas de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> 64 en medio de cultivo Run 20, en aerobiosis y anaerobiosis a pH 6.....	87
Figura 15: Cinéticas de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> 64 en permeado de suero formulado (Run 20), en anaerobiosis a pH 6, utilizando diferentes agentes de control de pH.....	88
Figura 16: Cinéticas de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> 64 en permeado de suero formulado (RUN 20), en anaerobiosis a diferente pH.....	88
Figura 17: Cinéticas de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> 64 en Run 20 con 2,5 y 5 g/L de triptona.....	89
Figura 18: Efecto del desafío térmico y oxidativo en la supervivencia de <i>L. rhamnosus</i> 64 cosechado en fase estacionaria temprana y desarrollado en Run 20, bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas.	91
Figura 19: Efecto del desafío térmico y oxidativo en la supervivencia de células de <i>L. rhamnosus</i> 64 cosechadas en fase exponencial o en fase estacionaria temprana, cultivadas en Run 20 y sometidas a estrés moderado con ácido, con calor, o sin aplicación de estrés.....	93
Figura 20: Curva de supervivencia de <i>L. rhamnosus</i> 64 en fase estacionaria temprana, durante el desafío con calor y el desafío oxidativo.....	96
Figura 21: Sobrevida al secado spray de <i>L. rhamnosus</i> 64 cosechado en fase estacionaria temprana, secado spray en diferentes matrices.....	98
Figura 22: Recuentos de células viables de <i>L. rhamnosus</i> 64 secado spray en suero de queso 10% (p/v) combinado con 10% (p/v) de goma arábica, almidón, WPC80 o maltodextrina, luego 120 días de almacenamiento a 5°C.....	99
Figura 23: Sobrevida de <i>L. rhamnosus</i> 64 al secado spray en suero de queso-almidón, y durante el almacenamiento a 5°C. Con o sin la aplicación de un estrés térmico moderado (45°C, 1 h) previo al secado spray.....	101
Figura 24: Actividad fagocítica de macrófagos peritoneales en animales que recibieron el cultivo de <i>L. rhamnosus</i> 64 fresco o secado spray	117

Figura 25: IgA secretoria en fluido intestinal de animales que recibieron el cultivo de <i>L. rhamnosus</i> 64 fresco o secado spray.....	118
Figura 26: Efecto de la administración oral de <i>L. rhamnosus</i> 64, durante 3, 6 y 10 días consecutivos, como cultivo fresco o secado spray (y reconstituido) en el número de células productoras de IgA en lámina propia de intestino delgado.....	119
Figura 27: Efecto de la administración oral a ratones BALB/c de <i>L. rhamnosus</i> 64, durante 3, 6 y 10 días, como cultivo fresco o secado spray, sobre la expresión de IL-2, IL-6, IL-10 en homogenatos de intestino delgado.....	122
Figura 27 (continuación): Efecto de la administración oral a ratones BALB/c de <i>L. rhamnosus</i> 64, durante 3, 6 y 10 días, como cultivo fresco o secado spray, sobre IFN, TNF-alfa en homogenatos de intestino delgado.....	123
Figura 28: Efecto de la administración oral a ratones BALB/c de <i>L. rhamnosus</i> 64, durante 3, 6 y 10 días, como cultivo fresco o secado spray, sobre la expresión de IL-2, IL-6, IL-10 en homogenatos de intestino grueso.....	125
Figura 28 (continuación): Efecto de la administración oral a ratones BALB/c de <i>L. rhamnosus</i> 64, durante 3, 6 y 10 días, como cultivo fresco o secado spray, sobre IFN, TNF-alfa en homogenatos de intestino grueso.....	126
Figura 29: Sobrevida de ratones control y de animales que recibieron durante 10 días un cultivo de <i>L. rhamnosus</i> 64 secado spray, a una infección con <i>Salmonella Typhimurium</i> Malbrán.....	136
Figura 30: Evaluación del daño e inflamación del colon según score de Wallace.....	142
Figura 31: Score macroscópico (Wallace) luego de la administración de <i>L. rhamnosus</i> 64, como cultivo fresco o secado spray en un modelo de colitis (TNBS) en ratones.....	144
Figura 32: Longitud del colon (cm) luego de la administración de <i>L. rhamnosus</i> 64 fresco o secado spray en un modelo de colitis (TNBS) en ratones.....	145
Figura 33: Pérdida de peso en animales control y en aquellos que recibieron <i>L. rhamnosus</i> 64, como cultivo fresco y secado spray, en un modelo de colitis (TNBS) en ratones.....	145

Figura 34: Diagrama de trabajo para la aplicación de estrés térmico moderado sobre la biomasa de <i>L. rhamnosus</i> 64 directamente en el fermentador y/o sobre las células resuspendidas en la solución de secado.....	157
Figura 35: Secadero spray escala piloto LABMAQ (FZEA, Universidad de San Pablo, Brasil).....	159
Figura 36: Equipamiento para la determinación de aw (AQUALAB).....	160
Figura 37: Equipamiento para determinación de tamaño y distribución de partículas.....	160
Figura 38: Secadero spray industrial Galaxie modelo 1612.....	162
Figura 39: Supervivencia de <i>L. rhamnosus</i> 64 al secado spray. Efecto de la temperatura de entrada y el flujo de aire, con un caudal de alimentación constante (15% = 4,5 mL/min).....	166
Figura 40: Efecto de la temperatura de entrada y el flujo de aire, con un caudal de alimentación constante (25% = 7,5 mL/min) sobre el porcentaje de humedad.....	167
Figura 41: Gráfico de contorno donde la variable respuesta es la humedad (líneas color naranja) con un caudal de alimentación constante 15% (4,5 mL/min).....	167
Figura 42: Muerte celular antes y después del secado spray de <i>L. rhamnosus</i> 64 en suero de queso - almidón, luego de la aplicación o no de estrés térmico moderado sobre la biomasa en el fermentador o en la solución de secado.....	169
Figura 43: Recuento de células viables (con la aplicación o no de un estrés térmico moderado sobre el fermentador o la solución de secado) de <i>L. rhamnosus</i> 64 durante la conservación a 5°C de cultivos deshidratados por secado spray en suero de queso - almidón.....	170
Figura 44: Recuento de células viables (con la aplicación o no de un estrés térmico moderado sobre el fermentador o la solución de secado) de <i>L. rhamnosus</i> 64 a los 180 días de conservación a 5°C.....	171
Figura 45: Morfología de las matrices utilizadas (suero de queso, almidón, WPC y maltodextrina) para deshidratar <i>L. rhamnosus</i> 64	175

Figura 46: Microcápsulas de en suero de queso – almidón 20% (p/v) conteniendo <i>L. rhamnosus</i> 64.....	177
Figura 47: Tamaño y distribución de micropartículas y Microscopía SEM de microcápsulas de <i>L. rhamnosus</i> 64 obtenidas en suero de queso - almidón sin tratamiento térmico y con tratamiento térmico.....	178
Figura 48: Tamaño y distribución de micropartículas y Microscopía SEM de microcápsulas de <i>L. rhamnosus</i> 64 obtenidas en suero de queso - almidón - WPC, sin tratamiento térmico y con tratamiento térmico.....	179
Figura 49: Tamaño y distribución de micropartículas y Microscopía SEM de microcápsulas de <i>L. rhamnosus</i> 64 obtenidas en suero de queso - WPC - maltodextrina, sin tratamiento térmico y con tratamiento térmico.....	181
Figura 50: Muerte celular de <i>L. rhamnosus</i> 64 secado spray en suero de queso combinado con almidón, WPC, o maltodextrina con la aplicación de un tratamiento térmico o no sobre la matriz de secado.....	183
Figura 51: Viabilidad durante el almacenamiento a 5°C de <i>L. rhamnosus</i> 64 deshidratado a escala piloto en suero de queso combinado con almidón, WPC, maltodextrina con la aplicación de un tratamiento térmico o no sobre la matriz de secado.....	185
Figura 52: Efecto de la temperatura de salida sobre la inactivación celular al secado spray industrial de <i>L. rhamnosus</i> 64 en suero de queso – almidón.....	187
Figura 53: Efecto de la temperatura de salida sobre la supervivencia en el tiempo (180 días) de <i>L. rhamnosus</i> 64 secado spray a escala piloto en suero de queso – almidón.....	188
Figura 54: Sobrevida de <i>L. rhamnosus</i> 64 secado en un secadero spray industrial en suero de queso - almidón y suero de queso - WPC - maltodextrina.....	189
Figura 55: Esquema de la adición de <i>L. rhamnosus</i> 64 a quesos miniatura reducidos en grasa.....	194
Figura 56: Coagulación y corte de cuajada en la elaboración de quesos miniatura.....	197

Figura 57: Esquema de elaboración de miniquesos controles y probióticos.....	
.....	198
Figura 58: Cambios de pH durante la acidificación de los quesos control y adicionados de <i>L. rhamnosus</i> 64 en los minimoldes.	200
Figura 59: Recuento microbiológico total, durante la conservación a 5°C, de los microorganismos del fermento starter en quesos controles, en quesos probióticos y recuento de <i>L. rhamnosus</i> 64 en el queso probiótico.....	202

Abreviaturas y símbolos.

a_w	Actividad acuosa (water activity)
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
CA	Caudal de alimentación
CD	Células Dendríticas
DSS	Dextrane sulfate sodium
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
FA	Flujo de aire
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
HC	Desafío térmico (Heat Challenge)
IgA	Inmunoglobulina A
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleuquina
MRS	Mann Rogosa y Sharpe
OC	Desafío oxidativo (Oxidative Challenge)
OMS	Organización Mundial de la Salud
TE	Temperatura de entrada
TNBS	Trinitrobenzene sulfonic acid
TS	Temperatura de salida
TRY	Triptona
UFC	Unidades formadoras de colonias.
WMB	Weissella Medium Broth
WPC	Concentrado de proteínas de suero (Whey protein concentrate)
YE	Extracto de levadura (Yeast extract)

Agradecimientos...

Quiero agradecer a mis directores por su apoyo, paciencia, dedicación, comprensión y confianza. Gracias Dr. Gabriel Vinderola por ayudar en mi formación profesional y sobre todo alentar la formación en el exterior para intercambiar experiencias con otros grupos de investigación. Gracias a mi co-directora Roxana Paez por alentarme siempre en el camino de la investigación, por su dedicación, amistad y confianza.

Al CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) por haberme posibilitado el desarrollo de la Tesis a través de las becas de posgrado que me fueron otorgadas.

Gracias a todos los grupos de INTA Rafaela que colaboraron y en especial a mi querido grupo de trabajo, a cada persona del Laboratorio de Calidad de Leche y Agroindustrias por siempre tener una palabra de aliento y por la voluntad para colaborar en cada actividad. Aprender a trabajar en equipo es un arte y estoy feliz de poder compartir cada día con ustedes. Gracias Gabi, Bele, Soni, Luci, Flor, Diane por ser incondicionales en el trabajo y en la vida. Gracias Alejandra Cuatrin por acompañarme en el camino de la estadística, pero también por cada mate, charla y tiempo compartido.

Gracias a todas las personas del INLAIN por siempre recibirme bien, gracias Patri, Agos, Flor, por su dedicación, confianza, trabajo y principalmente por su amistad ya que sin ustedes hubiera sido muy difícil llevar adelante los ensayos en Santa Fe.

A todas las personas que me acompañaron en mis experiencias en el exterior, a la Dra. Carmen Favaro – Trindade y a todo el personal del Laboratorio de Productos Funcionales de la Facultad de Zootecnia e Ingeniería de Alimentos de la Universidad de San Pablo. Al Dr. Eugenio Parente, al Dr. Rocco Iannello y al personal de Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali, Università degli Studi della Basilicata (Italia).

Quiero agradecer a mi familia por ser el pilar de mi vida y por entender y apoyar cada momento y decisión. Gracias a mi amor por acompañarme con confianza y paciencia.

A Emilia por darme nuevas prioridades....

A cada persona que se preocupó y me acompañó....Gracias!!!

Publicaciones.

Los resultados de este trabajo de Tesis fueron difundidos a través de las siguientes actividades:

Publicaciones en revistas internacionales con referato y revisión de pares

1. Lavari, L., Ianniello, R., Paez, R., Zotta, T., Cuatrin, A., 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. Food Science and Technology 63, 322-330.
2. Lavari, L., Páez, R., Cuatrin, A., Reinheimer, J., Vinderola G. (2014). Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli. Journal of Dairy Research 81, 267–274.

Publicaciones en encuentros científicos:

1. Lavari L, Burns P, Tavella A, Páez R, Teles Santos T, Uetanabaro AP, Reinheimer J, Vinderola G. (2015) Estudio *in vitro* e *in vivo* de la capacidad funcional de *Lactobacillus rhamnosus* 64. Efecto del secado spray. Jornadas Argentinas de Microbiología en Santa Fe. Santa fe, Argentina.
2. Paez R., Lavari L., Favaro-Trindade C., Thomazini M., Cuatrin A., Reinheimer J., Vinderola G. (2015) Dehydration of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in pilot spray dryer. Effect of matrix drying. Lavari Symposium IDF Dairy Products Concentration & Drying.
3. Lavari L., Favaro–Trindade C., Paez RB., Reinheimer J., Vinderola CG. (2014) Microencapsulación por secado spray de *Lactobacillus rhamnosus* 64 - Efecto de la matriz de secado y adaptación térmica. Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba (CICYTAC 2014).

4. Lavari L., Ianniello R., Zotta T., Páez R., Cuatrin A., Reinheimer J., Vinderola G., Parente (2013) E. Influence of heat, acid and oxygen MILD stress on the resistance to oxidative and thermal challenge of *Lactobacillus rhamnosus* 64. 10 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: "Impacto da Ciência de Alimentos na Nutrição e Saúde", realizado de 3 al 6 de Noviembre de 2013, Campinas - São Paulo - Brasil.
5. Lavari L., Paez R., Cuatrin A., Reinheimer, J., Vinderola G. (2013) Use of cheese whey for the biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli. 10 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: "Impacto da Ciência de Alimentos na Nutrição e Saúde", realizado de 3 al 6 de Noviembre de 2013, Campinas - São Paulo - Brasil.
6. Lavari L., Paez R., Cuatrin A., Reinheimer, J., Vinderola G. (2013) Utilización de suero de quesería para la producción de biomasa y secado spray de lactobacilos probióticos. XIV Congreso CYTAL. Rosario, 23 al 25 de octubre de 2013.
7. Lavari L., Paez R., Cuatrin A., Vinderola G. (2012) Utilización de subproductos lácteos para la producción de biomasa de bacterias probióticas autóctonas. COMUNICACIÓN ORAL. 1° Encuentro de intercambio de experiencias microbiológicas del litoral. 9-10 noviembre de 2012 (duración 15 horas).
8. Lavari L., Audero G., Cuatrin A., Vinderola G., Paez R. (2012) Optimización de las condiciones de secado spray de suero de queso como matriz de encapsulación de bacterias lácticas. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 14-15-16 de noviembre de 2012 (CICYTAC 2012). Córdoba, Argentina. Libro: IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba/Argentina 2012: Actas. ISBN-13: 978-987-28845-0-5.
9. Lavari L., Paez R., Cuatrin A., Vinderola G. (2012) Utilización de subproductos lácteos para la producción de biomasa de bacterias probióticas autóctonas. II Simposio Argentino de Lactología. Facultad de ingeniera química UNL. Santa Fe 16-17 de agosto de 2012. Libro de resúmenes: <http://www.fiq.unl.edu.ar/inlain/?cat=1>

10. Lavari L., Paez R., Cuatrin A., Vinderola G. (2012) Use of dairy by-products for the production of biomass of autochthonous probiotic bacteria. 16th World Congress of Food Science and Technology: "Addressing Global Food Security and Wellness through Food Science and Technology", Foz do Iguaçu, Parana, Brazil, on August 5 - 9, 2012.

El presente trabajo de Tesis fue realizado en el INTA EEA Rafaela y en el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) UNL – CONICET y se desarrolló en el marco de los proyectos de investigación:

- Fondo de Innovación Tecnológica Sectorial de Agroindustria – Lactosueros Proyecto FONARSEC N° 0003 "Ecosuero con valor agregado". Período 2011 – 2015.
- Proyecto INTA. "Tecnologías de preservación de alimentos y aprovechamiento de subproductos"- PNAIyAV-1130033. Período 2013-2016.
- "Desarrollo de cultivos probióticos nacionales a partir de cepas autóctonas de lactobacilos y bifidobacterias". Proyecto CAI+D Convocatoria 2011, Código 501 201101 00136 LI. Período 2013-2015.
- "Cultivos microbianos autóctonos para la producción de alimentos funcionales para humanos y animales utilizando secado spray". Proyecto PICT-2013-0260, categoría Equipo de Reciente Formación. ANPCyT Resolución N° 214/14, Inicio: 26/09/2014, Duración: 36 meses.

Resumen.

Día a día la sociedad toma mayor conciencia sobre la relación entre dieta y salud, y el deseo de una mejor calidad de vida estimula el consumo de alimentos funcionales con múltiples beneficios para la salud. Se considera alimento funcional a aquel que ha demostrado que actúa de forma beneficiosa sobre una o más funciones del cuerpo, más allá de su efecto nutricional, mejorando la salud y el bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedades. Estos efectos benéficos para la salud a través del consumo de alimentos, como restaurar las defensas naturales con menos efectos secundarios que las medicinas, resultan de interés para todos los grupos etarios. Por esta razón, la investigación y el desarrollo de ingredientes funcionales (probióticos, prebióticos, ácidos grasos poliinsaturados, entre otros) son actualmente un importante foco de desarrollo en la industria alimentaria. En este contexto, la producción de microorganismos probióticos autóctonos para su incorporación a alimentos funcionales resulta de potencial interés científico y para la industria de alimentos. En este sentido, uno de los desafíos de la industria alimentaria hoy es producir cultivos probióticos nacionales deshidratados a bajo costo.

En la presente Tesis Doctoral se abordó el desarrollo de un cultivo probiótico autóctono deshidratado por secado spray con potencial tecnológico y funcional para ser utilizado en alimentos o suplementos funcionales. En una primera etapa (Capítulo I) se evaluó el potencial tecnológico de tres cepas de lactobacilos pertenecientes a la colección del INLAIN: *L. paracasei* Jp1, *L. rhamnosus* 64 y *L. gasseri* 37, y la posibilidad de usar suero de queso como medio de crecimiento y como matriz de secado. Se optimizaron las condiciones de secado de la solución de suero de queso – almidón (sin células) para lograr condiciones de proceso adecuadas para la posterior deshidratación de microorganismos probióticos. Utilizando estas condiciones se deshidrató *L. rhamnosus* 64 en suero de

queso – almidón y se comparó con una de las matrices más utilizadas para la deshidratación de bacterias probióticas, la leche descremada en polvo.

Por su capacidad de desarrollar en subproductos lácteos (suero de quesería, suero de ricota, permeado de suero) como medios de cultivo de bajo costo, y por su resistencia al secado spray, se seleccionó *L. rhamnosus* 64 para los posteriores ensayos. En el Capítulo II se estudió la utilización de permeado de suero de queso como medio de cultivo, la aplicación de distintas condiciones de estrés para mejorar la resistencia intrínseca de la cepa al secado spray, y el uso de distintas matrices de secado (suero de queso combinado con almidón, WPC, maltodextrina o goma arábica). La suplementación de permeado de suero con extracto de levadura, triptona, Tween 80, Mg-Mn permitió la producción (en anaerobiosis y a pH controlado) de *L. rhamnosus* 64. Los resultados obtenidos hasta este punto, junto a algunos aspectos prácticos que podrían condicionar un futuro escalado (facilidad de manejo de los ingredientes, disponibilidad, solubilidad, costo, entre otros), fueron considerados en conjunto para elegir un tratamiento de estrés moderado y una matriz para el secado por pulverización. En particular, la aplicación de un estrés térmico moderado previo al secado spray tuvo un efecto positivo sobre la viabilidad celular durante la conservación del cultivo deshidratado a largo plazo. Tomando en cuenta la supervivencia a la deshidratación y al almacenamiento durante 120 días, y al mismo tiempo el menor costo del almidón respecto a las otras matrices, se seleccionó el empleo de suero de queso y almidón (20% de sólidos totales, relación 1:1) como matriz de secado. En cuanto a la aplicación de diferentes tipos de estrés, se eligió el estrés por calor en lugar del estrés por ácido ya que se obtuvieron tasas razonablemente similares en la supervivencia. Además, a mayor escala, la aplicación de un estrés por calor moderado es tecnológicamente más factible que la acidificación y neutralización de las suspensiones celulares.

En el capítulo III se realizaron estudios funcionales de *L. rhamnosus* 64 en animales de laboratorio, donde se evaluó el efecto del secado spray sobre la capacidad probiótica de la cepa y el comportamiento frente a modelos de salmonelosis e inflamación intestinal. En un modelo de inmunoestimulación, *L. rhamnosus* 64 se administró de forma oral, como

cultivo fresco y secado spray. La cepa en estudio demostró ser capaz de estimular las defensas intestinales. Por otro lado, el tratamiento tecnológico aplicado modificó la expresión de estos parámetros y de los perfiles de citoquinas. También se evaluó el potencial de *L. rhamnosus* 64 frente a modelos murinos de patologías intestinales. Si bien en un ensayo de salmonelosis la cepa en estudio no demostró efectos protectores en este modelo, como cultivo secado spray sí se observó un efecto protector frente a la colitis inducida por TNBS. La evaluación macroscópica de los tejidos permitió observar que los animales tratados con el cultivo secado spray presentaron un grado de inflamación menor que los tratados con el cultivo fresco y que los del grupo control. Si bien los resultados son preliminares y debería profundizarse el estudio, se observó que la administración de *L. rhamnosus* 64 como cultivo secado spray, podría tener un papel moderador de procesos inflamatorios intestinales.

Finalmente, en el capítulo IV se avanzó en la producción de un cultivo de *L. rhamnosus* 64 deshidratado por secado spray a escala piloto e industrial, y en la aplicación tecnológica del mismo.

En el capítulo IV-a se optimizaron (utilizando la metodología de superficie de respuesta) las condiciones del proceso de secado de la solución suero de queso – almidón conteniendo *L. rhamnosus* 64. Para lograr la mayor supervivencia de la cepa en estudio (principal variable respuesta) y un contenido de humedad entre 4 – 6%, se evaluó el efecto del flujo de aire, caudal de alimentación y temperatura de entrada. El caudal de alimentación, si bien no afectó la supervivencia, tuvo un efecto significativo sobre la humedad de los polvos. Finalmente, las condiciones optimizadas fueron: temperatura de entrada 130°C, flujo de aire 38 mm (450 L/h) y caudal de alimentación de 15% (4,5 mL/min). En este capítulo también se estudió el efecto de la aplicación de estrés térmico moderado (Capítulo IV, ítem 2.3) y luego la caracterización de las microcápsulas de diferentes matrices (con tratamiento térmico sobre la solución de secado) obtenidas en un secadero spray escala piloto (Capítulo IV, ítem 2.4). Los resultados fueron presentados en este orden a fines de facilitar su organización pero en realidad ambos aspectos están estrechamente relacionados por lo que han sido estudiados en paralelo a lo largo del

desarrollo de la presente Tesis. Para evaluar el efecto de la aplicación de estrés térmico moderado (45°C, 1 h), sobre la biomasa producida en el fermentador (como se realizó en el capítulo II) y/o en las células resuspendidas en la solución de secado (como se aplicó en trabajos anteriores del grupo y en el ítem 2.4 de este capítulo), se utilizaron las condiciones de fermentación seleccionadas en el capítulo II y las condiciones de secado optimizadas en el punto anterior. Se observó un efecto sobre el almacenamiento a los 180 días, obteniéndose la mejor supervivencia cuando el tratamiento térmico se aplicó sobre la biomasa en el fermentador.

La tecnología de deshidratación por secado spray está disponible a nivel nacional en medianas y grandes industrias lácteas, por lo que su escalamiento y aplicación serían factibles. En el cuarto ensayo del capítulo IV-a se evaluó la aplicación de un estrés térmico moderado (45°C, 1h) sobre diferentes matrices de secado (suero de queso – almidón; suero de queso – almidón – WPC y suero de queso – WPC – maltodextrina), y su efecto en la sobrevida de *L. rhamnosus* 64 al secado spray piloto y la viabilidad durante el almacenamiento del cultivo producido en permeado de suero de queso (a pH libre). Se logró obtener polvos con humedades satisfactorias ($\leq 6\%$) y sobrevida aceptable (reducciones de viabilidad ≤ 1 órdenes log en suero de queso – almidón y suero de queso – WPC – maltodextrina), mientras que la pérdida de viabilidad durante el almacenamiento fue > 2 órdenes log en todas las matrices. En el último ensayo de este capítulo se trabajó con un secadero spray escala industrial. Primero, debido a que son equipos con más variabilidad que los secaderos escala piloto, se llevó a cabo un trabajo para conocer el efecto de distintas temperaturas de salida (obtenidas ajustando la temperatura de entrada del equipo) sobre la supervivencia de *L. rhamnosus* 64 deshidratado en suero de queso – almidón. Se observó que a medida que aumentó la temperatura de salida, aumentó la muerte celular del cultivo deshidratado y disminuyó el porcentaje de humedad. A continuación, se seleccionaron las condiciones de temperatura de entrada de 173°C y de temperatura de salida de 79°C y se deshidrató un cultivo de la cepa, producido en el medio de cultivo optimizado en capítulo II (base permeado), a pH constante y con la aplicación de un estrés térmico moderado sobre la biomasa en el fermentador. Se

utilizaron dos matrices de secado: suero de queso-almidón y suero de queso-WPC-maltodextrina. Si bien no se observaron diferencias entre las mismas en la supervivencia al secado (2 órdenes log de muerte térmica), sí durante el almacenamiento.

Por último en el capítulo IV-b se adicionó un cultivo de *L. rhamnosus* 64 deshidratado en suero de queso-almidón (fue la matriz de referencia utilizada en este trabajo de tesis), obtenido en el secadero spray escala laboratorio, a un queso blando reducido en grasas. Se observó que la cepa no solo fue capaz de mantenerse viable en el mismo, sino además de desarrollar en esta matriz, lo que afectó negativamente las características organolépticas de los quesos.

En su conjunto, los resultados obtenidos sugieren que *L. rhamnosus* 64 posee potencial tecnológico para desarrollarse utilizando medios de cultivo económicos a partir de subproductos lácteos y ser producido mediante secado spray. Esta tecnología es adecuada y económica para la conservación ciertas bacterias probióticas y permite también la utilización de suero de queso, enriquecido con ingredientes tales como almidón, maltodextrina o concentrado de proteínas de suero como material de pared para su uso en alimentos funcionales. Además los resultados obtenidos en los estudios funcionales *in vivo* demuestran su robustez frente al secado spray, manteniendo la capacidad de estimular la función inmune. Los resultados de este trabajo de tesis permitieron avanzar en el conocimiento sobre el potencial de la deshidratación por secado spray para el desarrollo de cultivos probióticos utilizando cepas autóctonas y una tecnología de deshidratación ampliamente disponible en nuestro país en todas las etapas del escalado desde el laboratorio hasta el nivel industrial.

Summary.

Society's understanding about the relationship between diet and health is growing day by day and the desire for a better quality of life encourages the consumption of functional foods with multiple health benefits. Functional foods are considered as those, which have shown to act beneficially on one or more body functions, beyond their nutritional effects, improving the health and well-being and/or reducing the risk of diseases. These beneficial effects on health through food consumption, such as restoring natural defenses with fewer side effects than medicines, are of interest to all age groups. For this reason research and development of functional food components (probiotics, prebiotics, polyunsaturated fatty acids, among others) are currently a major focus for food industry. In this context, the production of autochthonous probiotic microorganisms for incorporation into functional foods is of potential scientific and industrial interest. In this sense, one present challenge of our food industry is to produce dehydrated natural probiotic cultures at low cost.

The aim of this Doctoral Thesis was to develop a spray-dried autochthonous probiotic culture, with technological and functional potential to be used in functional food or supplements. In a first stage (Chapter I), three strains of lactobacilli from the INLAIN collection were studied: *L. paracasei* Jp1, *L. rhamnosus* 64 and *L. gasseri* 37. Their technological potential was evaluated, with emphasis on using cheese whey as culture medium and as thermoprotectant or carrier for spray drying. First, spray drying of cheese whey-starch solution (without lactobacilli cells) was optimised, in order to find the suitable process conditions for dehydration of probiotic microorganisms. These conditions were then used to dehydrate a culture of *L. rhamnosus* 64 resuspended in cheese whey-starch, whereas skim milk-starch was used as reference matrix.

Due to its capacity to develop in dairy media (cheese and ricotta whey and whey permeate) and its resistance to spray drying, *L. rhamnosus* 64 was selected for further studies. In Chapter II, biomass production in whey permeate supplemented with different ingredients was optimized. Also, the effect of mild stresses to improve the intrinsic

resistance of the strain to spray drying and the use of different carriers (cheese whey combined with starch, WPC, maltodextrin and arabic gum) were studied. Supplementation of whey permeate with yeast extract, tryptone, Tween 80 and Mg-Mn produced ca. 10^{10} CFU/mL of *L. rhamnosus* 64 under pH controlled fermentation in anaerobiosis. Results obtained up to this point, together with some practical aspects that could be relevant in a future scaling-up (easiness of use of some ingredients, availability, solubility, costs), were considered altogether in order to choose a treatment of mild stress and the carrier for spray drying. In particular, the application of mild heat stress prior to spray drying was effective during storage. Considering survival to spray drying, stability to storage for 120 days and the lower cost of starch, compared to the other carriers, cheese whey-starch was selected. As for the application of mild stresses, heat stress was chosen over acid stress since similar survival rates were obtained and, in addition, at a larger scale the application of mild heat stress is more feasible than acidification.

In Chapter III the functional characteristics of *L. rhamnosus* 64 were studied in *in vivo* models, in particular the effect of spray drying on its functional properties. The strain showed, in different experimental models, to be able to stimulate the gut mucosa immune response. A shift in the immune parameters, particularly the cytokine profile, was observed for mice treated with the spray dried culture. Also, *L. rhamnosus* 64 potential for the treatment of intestinal pathologies was studied. In a salmonellosis study, no protective effects were observed, and no reduction of mortality was detected between treated and control groups. However, a significant anti-inflammatory effect was observed in an acute colitis model (induced by TNBS) for the animals of the spray-dried treated group, compared to the control and fresh culture groups. Even if these results are preliminary, and further studies should be conducted, the administration of spray dried *L. rhamnosus* 64 culture could contribute to the treatment of inflammatory intestinal processes.

Finally in Chapter IV, the scaling up for the production of a spray dried culture of *L. rhamnosus* 64 and its technological applications were further studied.

In Chapter IV-a the spray drying conditions were optimized, using cheese whey-starch as carrier. To achieve high survival rate (main outcome variable) and satisfactory moisture content (4-6%), air flux, feeding rate and inlet temperature were evaluated. Finally, the optimized conditions were: inlet temperature 130°C, air flux 38 mm (450 L/h) and feeding rate 15% (4.5 mL/min). In this chapter also the effect of the application of mild heat stress (Chapter IV, item 2.3) and the characterization of microcapsules of different carriers (with heat treatment on drying solution) obtained in a pilot scale spray dryer (Chapter IV, item 2.4) were studied. The results of these two trials were presented in this order to facilitate the organization of the chapter but in fact they are closely related so they have been studied in parallel during the development of this work. To evaluate the effect of mild heat stress (45 °C, 1 h) on the biomass produced in the fermenter (as done in Chapter II) and / or on the cells resuspended in the drying solution, the fermentation conditions optimized in Chapter II and the drying conditions optimized in the previous section were used. An effect on storage at 180 days was observed and the higher survival was detected when mild heat stress was applied on the biomass in the fermenter.

Spray drying is widely used in Argentina, and available in both medium and large size dairy industries, so the application and scaling-up of the technology for the production of the dehydrated culture would be feasible. In the fourth trial of Chapter IV-a, the application of mild heat stress (45 ° C, 1h) on different carriers (cheese whey-starch; cheese whey-starch-WPC and cheese whey-WPC-maltodextrin), and its effect on the survival of *L. rhamnosus* 64 during pilot-scale drying and storage of the culture produced in cheese whey permeate (at free pH) were evaluated. Powders with satisfactory moisture ($\leq 6\%$) and survival (viability loss ≤ 1 log order in cheese whey-starch and cheese whey-WPC-maltodextrin) were obtained, while the loss of viability during storage was > 2 log orders for all carriers. In the last trial of this chapter, an industrial scale spray drier was used. First, because industrial dryers have more variability than pilot scale ones, the effect of different outlet temperatures (obtained by adjusting the inlet temperature) on the survival of *L. rhamnosus* 64 dehydrated in cheese whey-starch was evaluated. As the outlet temperature increased (from 71 to 88 ° C), higher cell death and lower moisture

content (from 8 to 5.5%) were observed. Next, an inlet temperature of 173 °C and outlet temperature of 79 °C were selected and a culture of the strain, produced in the culture medium optimized in chapter II (permeate-based) at constant pH and subjected to a mild heat stress in the fermenter, was dehydrated. Two drying solutions were used: cheese whey-starch and cheese whey-WPC-maltodextrin. Even if no differences between both carriers were observed in survival after drying (2 orders log), when *L. rhamnosus* 64 was dehydrated in cheese whey-WPC-maltodextrin, after 180 days cell death was 1.46 log orders, while in cheese whey-starch it was 2.29 log orders.

Finally, in Chapter IV-b a culture of *L. rhamnosus* 64 spray-dried in cheese whey-starch was added to a low fat soft cheese. It was observed that the strain was not only able to remain viable but also to grow on the product, which negatively affected the organoleptic characteristics of the cheese.

Taken together, these results suggest that *L. rhamnosus* 64 has technological potential to grow in economic dairy culture media and to be produced by spray drying. This technology is suitable and economical for the preservation of certain probiotic bacteria and also allows the use of cheese whey, enriched with ingredients such as starch, maltodextrin or whey protein concentrate as wall material for use in functional foods. In addition, the results from the *in vivo* functional studies demonstrate their robustness against spray drying, maintaining the capacity to stimulate the mucosal immune function. The results of this work allowed us to go forward on the knowledge about the potential of dehydration by spray drying for the development of probiotic cultures using a technology which is widely available in our country from the laboratory to the industrial level.

Introducción general.

1- ALIMENTOS PROBIÓTICOS.

La relación positiva entre una dieta adecuada y la salud está creciendo día a día, el deseo de una mejor calidad de vida estimula el consumo de alimentos funcionales con múltiples beneficios para la salud (Vasiljevic y Shah, 2008). Se considera alimento funcional a aquel que *“ha demostrado que actúa de forma beneficiosa sobre una o más funciones del cuerpo, más allá de su efecto nutricional, mejorando la salud y el bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedad”* (Diplock, 1999). Estos efectos benéficos para la salud a través del consumo de alimentos, como restaurar las defensas naturales con menos efectos secundarios que la medicina, resultan de interés para todos los grupos etarios (Reid, 2002). Por esta razón la investigación y el desarrollo de ingredientes funcionales (probióticos, prebióticos, ácidos grasos poliinsaturados, entre otros) son actualmente un importante foco de desarrollo en la industria alimentaria.

En las últimas décadas se le ha otorgado un preponderante interés al uso de bacterias ácido lácticas (BAL) como probióticos. El mercado de alimentos funcionales, en particular aquellos que incorporan bacterias probióticas, se encuentra en constante expansión debido a la adopción progresiva del consumidor de hábitos de vida más saludables.

El concepto de probióticos no es nuevo, Hipócrates consideraba que la leche fermentada podría curar algunas enfermedades del sistema digestivo y de hecho estas bacterias han sido consumidas por los seres humanos en forma de alimentos fermentados durante miles de años (Cruz y col., 2001; Kopp-Hoolihan, 2001). Fue en 1907 que el científico ruso Elie Metchnikoff relacionó el consumo de grandes cantidades de productos fermentados que contenían lactobacilos con la prolongación de la vida, y dió la primera explicación científica de los efectos beneficiosos de las bacterias lácticas presentes en las leches fermentadas (Rasic y col., 2003). En los últimos años, ha surgido un interés renovado en el uso de microorganismos en alimentos debido a su aporte en el sabor y aroma, pero principalmente por sus efectos beneficiosos en la salud y el tratamiento de

ciertas patologías. Así, la Organización Mundial de la Salud (OMS) redefinió en 2002 el concepto de probióticos como “*aquellos microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas confieren algún efecto benéfico en la salud del hospedador*”. Hoy en día se acepta que la ingesta diaria de probióticos contribuye a mejorar y mantener la diversidad de la microbiota intestinal y evita trastornos gastrointestinales (Lavermicocca y col., 2006). Por esta razón, y por la gran cantidad de efectos benéficos demostrados que poseen estos microorganismos, la búsqueda de nuevas cepas con propiedades probióticas específicas es constante, sin embargo, antes de ser incorporadas a un alimento, su eficacia y viabilidad deben ser comprobadas. La selección de cepas se realiza teniendo en cuenta los beneficios que éstas producen al hospedador, mediante el estudio *in vitro* e *in vivo* de las propiedades probióticas. Según el Código Alimentario Argentino, Artículo 1389 - (Resolución Conjunta SPReI N° 261/2011 y SAGyP N° 22/2011), para que una cepa pueda ser utilizada como ingrediente probiótico para alimentos, deberá cumplir con el **Protocolo de evaluación de un probiótico como ingrediente para alimentos**. (Anexo I).

Los cultivos comerciales utilizados en distintos alimentos probióticos son principalmente cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y han sido explotados ampliamente por la industria láctea como herramienta para el desarrollo de productos funcionales. Cepas específicas de especies del género *Lactobacillus*, tales como *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei* y *L. plantarum*, se encuentran entre los microorganismos probióticos más comunes con beneficios demostrados en humanos (Soukoulis y col., 2013). Se han incorporado a una amplia variedad de alimentos, tanto en productos lácteos (yogur, queso, helados, postres lácteos), como en productos no lácteos (chocolate, cereales, jugos de fruta) (Vinderola y col., 2000a; Anal y Singh, 2007; Anekella y Orsat 2014).

El mercado de alimentos probióticos ha crecido rápidamente sin signos de desacelere a corto plazo, según el estudio de mercado de BCC Research (2014), el mercado mundial de ingredientes probióticos, suplementos y alimentos llegó a casi \$27,1 mil millones en 2013 y subirá a una tasa compuesta de crecimiento anual del 6,2% durante los próximos cinco años para llegar a \$36,7 mil millones en 2018.

A nivel nacional, la mayoría de los cultivos probióticos utilizados son liofilizados o congelados, deben importarse y son comercializados por empresas multinacionales (Chr. Hansen, DSM, Sacco, Danisco). Estas características condicionan su uso casi exclusivo a las grandes empresas lácteas. La posible disponibilidad de cultivos probióticos autóctonos, producidos a menor costo que los importados y que se puedan producir a gran escala, podría ser uno de los factores que contribuya al sostenimiento de la expansión del mercado de alimentos funcionales producidos por empresas nacionales de menor porte mediante la valorización de cepas aisladas en la región.

Por otro lado, un trabajo reciente (Sybesma y col., 2015) puso en valor el desarrollo de cultivos probióticos en países en desarrollo a partir de cepas autóctonas basado en cinco postulados: 1) la necesidad particular de determinados nutrientes y requerimientos de salud, 2) la valorización de cepas locales, 3) el aprovechamiento de tecnologías disponibles localmente, 4) diferencias en la microbiota entre individuos de diferentes regiones del mundo y 5) la sobrevida de los probióticos en los alimentos que se consumen en la región.

2. VIABILIDAD Y FUNCIONALIDAD DE BACTERIAS PROBIÓTICAS.

El incremento del consumo de alimentos probióticos plantea la necesidad por parte de la industria alimentaria de generar mayor conocimiento científico para desarrollar nuevos métodos que permitan buscar alternativas de producción más efectivas o de menores costos. Muchos son los factores que pueden afectar la estabilidad, viabilidad y funcionalidad de los probióticos como cultivos puros o adicionados a una matriz alimentaria, tales como la acidez del producto, disponibilidad de nutrientes, presencia de oxígeno debido a la permeabilidad del envase, presión osmótica, producción de peróxido de hidrógeno, temperatura de almacenamiento y la posible interacción con otras especies microbianas.

La funcionalidad de los alimentos probióticos depende del número de células viables y activas por gramo o mililitro presentes en el alimento al momento del consumo

(Korbekandi y col., 2011). El criterio científico de algún modo generalizado (Champagne y col., 1997; Ross y col., 2005) y la legislación actual requieren una concentración particular de células viables en determinados productos para poder ser denominados alimentos probióticos. A fin de poder actuar favoreciendo la salud, los probióticos deben estar presentes en el alimento como mínimo en una concentración de 10^7 UFC/mL o g al momento del consumo, sugiriéndose un rango de concentración de $10^7 - 10^9$ UFC/mL o g (Shah, 2000; Vinderola y Reinheimer, 2000; Gardiner y col., 2002), aunque la concentración efectiva depende de la cepa, del efecto que se busque y será determinada en el estudio clínico que demuestre resultados positivos para esa concentración de células viables, no siendo posible generalizar que existe una concentración (o dosis) única en la cual todos los probióticos son efectivos.

Desde que los microorganismos probióticos son incorporados a los alimentos, la viabilidad celular, medida a través de recuentos en placas, es utilizada de rutina para monitorear la funcionalidad durante el almacenamiento de los mismos. Por lo tanto, es esencial asegurar una alta tasa de supervivencia durante la producción y la vida útil del producto (Saxelin y col., 1999; Cruz y col., 2010).

Se han identificado factores que afectan la actividad celular durante el proceso de producción de bacterias probióticas, los cuales se pueden clasificar en intrínsecos y extrínsecos. Los factores intrínsecos son características propias de las células y afectan principalmente la tolerancia al estrés de las mismas. Esta tolerancia presenta una gran variabilidad entre especies y cepas y puede ser modificada alterando las condiciones de cultivo, incluyendo la fase de crecimiento donde se realiza la cosecha de células, la composición del medio de cultivo y la aplicación de tratamientos (de estrés moderado) de adaptación. Los factores extrínsecos influyen en la viabilidad celular e incluyen las tecnologías de producción de cultivos deshidratados, condiciones de congelamiento o secado, el carrier utilizado, condiciones de almacenamiento, entre otros.

Aunque se conoce como algunos factores durante el procesamiento pueden afectar la viabilidad de los microorganismos probióticos, aún no se sabe completamente el

impacto de los parámetros de los procesos sobre la funcionalidad de los cultivos (Nikolova y col., 2015).

Con respecto a la funcionalidad, y teniendo en cuenta que en general las respuestas a los factores de estrés presentes durante la producción de microorganismos probióticos es cepa dependiente, es indispensable realizar ensayos para evaluar el efecto que pueden tener los mismos sobre la salud humana. Esta evidencia se obtiene mediante la realización de estudios *in vitro* e *in vivo*. Los primeros son útiles como métodos de screening y para entender el mecanismo por el cual el probiótico ejerce su efecto. Sin embargo, debido a la complejidad de los sistemas vivos y a las variaciones individuales, los experimentos *in vitro* no proveen evidencia completa o definitiva. Solo las investigaciones *in vivo* permiten verificar la eficiencia de los probióticos a través de la realización de diferentes tipos de estudios en animales y en humanos (Doherty y col., 2012). Uno de los modelos animales más utilizado es el modelo murino y, debido al hecho de que el principal sitio de acción es el intestino, uno de los principales indicadores de funcionalidad es la capacidad de modificar los niveles de Inmunoglobulina A (IgA) y citoquinas en el intestino, tanto en un modelo animal (Vinderola y col., 2007; Souza y col., 2012) como en humanos (Kabeerdoss y col., 2011; Holscher y col., 2012).

3. PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE BACTERIAS PROBIÓTICAS.

Se han descrito diferentes posibilidades de producción de microorganismos probióticos para su aplicación en alimentos (Makinen y col., 2012). Un proceso clásico es producir probióticos en un medio de cultivo industrial previo a la adición en la matriz alimentaria. Esto permite maximizar el rendimiento de la biomasa durante la fermentación. Las células son separadas del medio de crecimiento, ya sea por filtración o centrifugación, cuando el recuento alcanza un máximo y la curva de crecimiento cae debido a la carencia de nutrientes o a la acumulación de sustancias inhibitorias. Esta biomasa probiótica puede ser congelada o deshidratada. En el caso de cultivos deshidratados, estos pueden mezclarse en seco con la matriz alimentaria final. Ejemplos de este proceso se dan en formulas infantiles, leche en polvo, cereales, etc.

Para mejorar la estabilidad de las bacterias probióticas durante su producción, se han utilizado diferentes estrategias que incluyen enfoques tecnológicos, como la modificación de los parámetros de producción o la reformulación de productos, así como enfoques microbiológicos, que se centraron en la resistencia intrínseca de la cepa, utilizando tanto la selección de cepas naturales con las propiedades deseadas, como la adaptación de las cepas al estrés (Gueimonde y Sánchez, 2012). La bibliografía demuestra que el aspecto tecnológico debe ser analizado exhaustivamente para que las cepas potencialmente probióticas puedan ser incluidas en alimentos (Makinen y col., 2012). En general hay tres factores que definen la estabilidad de las bacterias probióticas durante la producción y el almacenamiento de los cultivos:

1- La robustez de las cepas: la estabilidad intrínseca es variable entre cepas, estas responden de diferente manera a las condiciones industriales de proceso y es un criterio útil a la hora de seleccionar un probiótico para adicionar en alimentos, esta estabilidad intrínseca es el punto de partida para poder manejar las condiciones del proceso y/o almacenamiento. Un cultivo probiótico con buenas propiedades *in vivo*, pero que no revista robustez tecnológica, difícilmente se podrá utilizar en el desarrollo de un producto.

2- Las condiciones de proceso: Es importante lograr un equilibrio entre maximizar la supervivencia de las bacterias probióticas y las condiciones del proceso de producción de biomasa. Se deben controlar los cambios que se producen cuando se realiza el escalado del proceso, en este sentido la composición del medio de cultivo, agitación, temperatura de crecimiento y pH pueden producir cambios que afecten la estabilidad de las bacterias durante el procesamiento y almacenamiento.

3- Las condiciones de almacenamiento: La tecnología y matriz de conservación, la temperatura, el envase y el tiempo de almacenamiento condicionan la vida útil de los cultivos probióticos.

Las bacterias probióticas son microorganismos nutricionalmente exigentes que requieren numerosos nutrientes para crecer adecuadamente. Para la producción de bacterias probióticas a gran escala y su adición en alimentos no sólo deben ser

considerados los aspectos biológicos y funcionales de las mismas, sino también los aspectos tecnológicos. Los criterios de selección de cepas probióticas candidatas para ser incorporadas en alimentos se fundamentan principalmente en sus propiedades tecnológicas, quedando muchas veces en el camino cepas con propiedades prometedoras para la salud pero que no cumplen con los requisitos tecnológicos necesarios para ser escaladas, producidas y adicionadas a un producto (Ross y col., 2005; Lacroix y Yildirim, 2007). El criterio de selección debe incluir la capacidad de crecer en medios relativamente económicos, de ser congeladas o deshidratadas, y mantener la viabilidad y funcionalidad durante la vida útil del alimento.

A escala laboratorio el medio de cultivo más ampliamente utilizado para el crecimiento de BAL y bifidobacterias es el medio formulado por Mann, Rogosa y Sharpe (MRS). Si bien la eficiencia de producción de biomasa de este medio en su versión comercial es muy buena, su uso a escala piloto o industrial no resulta viable económicamente debido a su alto costo. En este sentido y favorecido por la creciente conciencia ecológica sobre la importancia de la reducción de la contaminación industrial, se ha estimulado el uso de ciertos efluentes como medios de cultivo "no tradicionales". Este enfoque tiene dos ventajas: la disminución de los costos industriales derivados de descontaminación de efluentes y el menor costo de los medios de cultivo. En este sentido hay estudios previos sobre medios de crecimiento económicos en base a sustratos lácteos como suero de queso y permeado de suero de queso (Pintado y col. 1999, Guerra y Pastrana 2002).

El suero de queso obtenido de la precipitación de la caseína en la fabricación de quesos, durante muchos años se consideró como un desperdicio y agente contaminante. Este punto de vista ha cambiado en los últimos años debido a que dicho subproducto es una fuente de materias primas, ya que cada uno de sus componentes puede ser utilizado de alguna forma, a través de procesos más o menos sofisticados. Por ejemplo las proteínas de suero están siendo utilizadas en la producción de alimentos funcionales como fórmulas infantiles, bebidas fortificadas, batidos de proteínas de suero entre otros (Madureira y col., 2007). Existe un interés creciente de la industria de alimentos de

diseñar y formular productos que incorporen componentes bioactivos específicos de proteínas de suero de queso (Mendes da Silva, 2011).

4- CONSERVACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS.

Los cultivos lácticos iniciadores y los cultivos probióticos son en mayor medida conservados y distribuidos como cultivos congelados o liofilizados. Los cultivos congelados ocupan gran volumen y deben ser mantenidos a temperaturas bajo cero que causan altos costos de almacenamiento, transporte y energía, por lo tanto es preferible la conservación en forma deshidratada (Johnson y Etzel, 1995). La técnica más utilizada para la deshidratación industrial de BAL es la liofilización. Esta tecnología es eficaz para la conservación de productos biológicos ya que no implica una exposición prolongada a tratamientos térmicos severos, pero es un proceso costoso, discontinuo y con bajos rendimientos. El secado spray por atomización o por pulverización ofrece una alternativa económicamente más accesible con altas tasas de producción (Zamora y col., 2006) y proporciona una barrera física al microorganismo frente a condiciones ambientales adversas.

En la industria alimentaria se utilizan diferentes tecnologías llamadas de microencapsulación (ME) para que diferentes compuestos (vitaminas, minerales, colorantes, prebióticos, probióticos, saborizantes, antioxidantes, aceites esenciales, enzimas) resistan mejor las condiciones de procesamiento, almacenamiento, transporte y comercialización, (Jiménez-Colmenero y col., 2013). Las técnicas más utilizadas para la ME de microorganismos probióticos son la emulsificación, la extrusión, el secado por atomización o secado spray (Rokka y col., 2010). Esta última es una tecnología ampliamente utilizada en la industria alimentaria (Gharsallaoui y col., 2007) debido a su sencillez y bajo costo como así también a la disponibilidad de equipos a distintas escalas, y la posibilidad de producir a escala industrial en modo continuo (Shu y col., 2006). El concepto de que microencapsular protege de las condiciones ambientales adversas es relativo, ya que depende no solo de la tecnología utilizada, sino de los materiales

utilizados para formar la microcápsula y del medio ambiente con el cual estará en contacto la misma.

La selección del material para microencapsulación involucra frecuentemente procedimientos de prueba y error (Gharsallaoui y col., 2007). Sin embargo, existen algunos criterios para la elección de las matrices basados en sus propiedades reológicas, su habilidad para dispersar o emulsionar el ingrediente activo y la compatibilidad química con el mismo, su capacidad para protegerlo frente a condiciones ambientales adversas, entre otros aspectos. En general, no existe un compuesto único que presente todas estas características y, por ende, en la práctica cada material se utiliza modificado o en combinación con otras sustancias como antioxidantes, agentes quelantes y/o surfactantes (Desai y Park, 2005).

Más allá de las ventajas mencionadas, la tecnología de microencapsulación por secado spray, en la actualidad y sobre todo cuando se trata de microorganismos probióticos para su aplicación en alimentos, tiene aún numerosos obstáculos tecnológicos que superar. Particularmente los productos probióticos deshidratados se declaran, en general, como probióticos microencapsulados aunque la única transformación en este caso sea el proceso de deshidratación *per se* y en consecuencia, las cápsulas/polvos resultantes son en su mayoría solubles en agua. Por lo tanto, los efectos protectores de estos polvos para su aplicación en alimentos son limitados. Estas partículas son solubles en agua y sólo tienen un efecto de barrera durante el almacenamiento en seco, pero no en productos alimenticios líquidos y durante la digestión (Heidebach y col., 2010).

4.1. Secado spray. Principios de la tecnología.

El secado por atomización es, por definición, la remoción de casi todo el líquido por vaporización, de una solución de sólidos no volátiles (Perry y col., 1985). Este proceso está dividido en tres etapas: la atomización propiamente dicha, el contacto con el aire caliente y la evaporación de la humedad. Cada etapa es llevada a cabo de acuerdo al diseño y las

condiciones de operación del equipo y, junto con las propiedades fisicoquímicas del líquido, determinan las características del producto deshidratado (Cal y Sollohub, 2010). La atomización es un proceso en el cual el líquido se fracciona en millones de gotas individuales formando un spray. El tamaño y la distribución de las gotas son una de las características más importantes de un secadero por atomización. La selección del tipo de atomizador, rotatorio o de toberas, depende de la naturaleza de la alimentación y de las características deseadas para el producto deshidratado (Cal y Sollohub, 2010).

El secado spray aplicado como método de encapsulación de bacterias probióticas, consiste en atomizar con aire caliente una suspensión o emulsión previamente homogeneizada de probióticos en la matriz del material elegido para encapsular (Fig. 1), consiguiendo con ello una rápida evaporación del solvente (agua) y los microorganismos probióticos inmovilizados dentro de partículas de polvo (de Vos y col., 2010; Burgain y col., 2011).

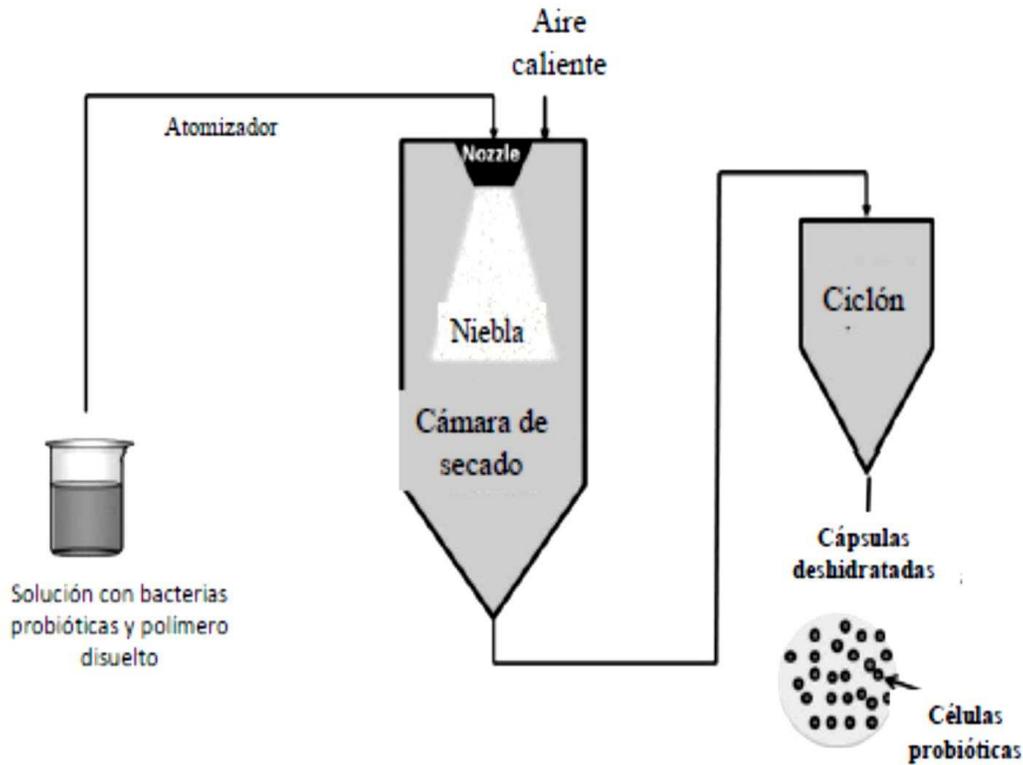


Figura 1: Esquema del secado spray aplicado como método de encapsulación de bacterias probióticas (adaptado de Burgain y col., 2011).

La selección y adición de agentes protectores a los cultivos es un paso necesario para proteger las células durante el secado y el almacenamiento. Diferentes materiales alimenticios se han utilizado para la deshidratación de los probióticos mediante secado por pulverización, tales como almidones (Ying y col., 2010; Paez y col. 2012), maltodextrina (Lian y col., 2002), gomas (Chávez y Ledebøer, 2007), gelatina (Lian y col., 2002), proteínas de suero (Ying y col., 2010; Soukoulis y col., 2013), suero de queso (De Castro-Cislaghi y col., 2012), y leche descremada reconstituida (Golowcycz y col., 2010; Paez y col., 2012). Entre estos materiales, la leche descremada ha demostrado ser un potente protector de la viabilidad celular durante el secado spray (Fu y Chen, 2011; Silva y col., 2011; Paéz y col., 2012). Varios autores, sugieren que la eficiencia de las matrices lácteas en la protección de la viabilidad celular durante el secado, está relacionado con la

presencia de componentes lácteos (Ananta y col., 2005; Fu y Chen, 2011). Durante la eliminación de agua, se cree que la lactosa al interactuar con los grupos polares de los fosfolípidos y proteínas de la membrana celular, minimiza los daños a la membrana durante el secado por pulverización y prolonga el almacenamiento (Ananta y col., 2005; Santivarangkna y col., 2008).

4.1.1. PARÁMETROS DEL PROCESO Y EFECTOS SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO.

El secado por pulverización es un método en el que el resultado depende en gran medida de las propiedades de la solución a ser deshidratada, al igual que de las condiciones utilizadas (caudal del líquido y del aire de entrada, temperatura y humedad del aire de entrada, temperatura de salida y aspiración). La combinación de estos parámetros va a influenciar las características del producto en polvo obtenido (humedad, rendimiento de producción y tamaño de partícula). Para los productos sensibles al calor la principal estrategia para mantener su calidad o actividad es mantener una baja temperatura de salida, en el caso de microorganismos probióticos se recomienda que sea menor a 85°C (Ananta y col., 2005).

La temperatura de salida no puede ser controlada directamente, pero puede ser manipulada mediante la combinación de los parámetros de secado utilizados. Si el secado es insuficiente (por priorizar una baja temperatura de salida) se pueden presentar polvos con un contenido de humedad elevado (> 6%) y defectos comunes en los productos como la pegajosidad de las partículas (stickness) que puede ser un problema para el rendimiento, la recuperación del polvo y la estabilidad durante el almacenamiento (Masters, 1991). La velocidad de alimentación se debe ajustar de manera que el líquido presente en las gotas pueda evaporarse antes de entrar en contacto con las paredes de la cámara de secado. El exceso de velocidad de alimentación conduce a una disminución en la temperatura de salida (porque se evapora menos cantidad de agua) y una acumulación de material en las paredes de la cámara (Oliveira y Petrovick, 2009).

El líquido pulverizado adquiere la temperatura de entrada del aire de secado. La temperatura de entrada puede influir en la eficiencia de secado, en la cantidad de agua eliminada, en el contenido de agua residual y en las propiedades del producto final porque junto con la alimentación y el flujo de aire de secado, son responsables de la evaporación del agua. Esta interdependencia de las variables es lo que hace que controlar el proceso sea una cuestión compleja, tanto para obtener un producto de calidad en cuanto a las especificaciones de los productos deshidratados, como para minimizar el impacto sobre la viabilidad de las bacterias probióticas (Santivarangkna y col., 2007; Cal y Sollohub, 2010).

En el enfoque clásico de los estudios de optimización se llevan a cabo ensayos denominados prueba – error, donde un solo parámetro se cambia, manteniendo constantes los demás. Se requiere mucho tiempo y un gran número de experimentos con este método. Además, este enfoque ignora las posibles interacciones entre los parámetros que pueden conducir a confusión de los resultados, y no tiene capacidad de predicción (Huang y col., 2006). Con el fin de superar estos problemas, los estudios de optimización se deben realizar utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM, por sus siglas en inglés). Esta es una técnica estadística eficiente para la optimización de múltiples variables con el fin de predecir las mejores condiciones de rendimiento con un número mínimo de experimentos (Gouda y col., 2001). Este método se ha aplicado con éxito en muchas áreas de investigación, como la optimización de las condiciones de fabricación y producción, la composición de medios de cultivo y estudio de la estabilidad de diversos organismos (Huang y col., 2006; Fung y col., 2008).

Objetivos.

OBJETIVO GENERAL

Generar conocimientos científico y tecnológico sobre la producción de bacterias probióticas autóctonas deshidratadas por secado spray mediante el aprovechamiento de subproductos lácteos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Evaluar las condiciones de producción de biomasa de bacterias probióticas autóctonas en diferentes sustratos lácteos (suero de quesería, suero de ricota, permeado de suero) y en medios de cultivo formulados (Capítulo I).
- 2) Optimizar la producción de biomasa en permeado de suero. Aplicación de diferentes factores de estrés para inducir mejoras en el proceso (Capítulo II).
- 3) Determinar las propiedades funcionales del cultivo probiótico autóctono deshidratado en modelos *in vivo* aplicando un modelo murino (Capítulo III).
- 4) Avanzar en el escalado del proceso de proceso secado. (Capítulo IV-a).
- 5) Aplicar el cultivo probiótico deshidratado en quesos blandos reducidos en materia grasa (Capítulo IV-b).

CAPITULO I: Utilización de suero de queso para la producción de biomasa y secado spray de lactobacilos probióticos.



1. INTRODUCCIÓN.

El suero de queso es un líquido verde-amarillento producido durante el proceso de fabricación del queso tradicional que resulta de la precipitación y la eliminación de la caseína de la leche (Siso, 1996). Este producto posee una carga orgánica relativamente alta, la cual se monitorea con la medición de DBO (demanda biológica de oxígeno) y DQO (demanda química de oxígeno) (Prazeres y col., 2012). El suero representa del 80 – 90% del volumen total de la leche procesada en elaboraciones casearias y contiene aproximadamente el 50% de los nutrientes de la misma: proteínas solubles, lactosa, vitaminas y sales minerales.

El suero de queso es un efluente con una gran carga orgánica y salina pero al mismo tiempo es un producto con un alto valor nutricional y con grandes posibilidades de explotación tecnológica. Debido a esto, se comenzó a utilizar como materia prima de productos de alto valor nutritivo, dejando de ser solo un desecho industrial altamente contaminante. En los últimos años el volumen de suero procesado mediante distintas tecnologías aumentó considerablemente, la producción global de lactosuero ascendió de 186 millones de toneladas en el año 2008 a 190 millones de toneladas en 2012. El mercado de los ingredientes de suero, productos con mayor valor agregado, es de cerca de 3,2 millones de toneladas por año. La Unión Europea (UE) y los EEUU producen alrededor del 70% del volumen mundial de este producto. En la Argentina existen aproximadamente 12 plantas procesadoras de suero de leche, en su mayoría localizadas en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe. De las tecnologías disponibles en la actualidad para el tratamiento de suero, en nuestro país pueden obtenerse productos como suero en polvo, suero en polvo desmineralizado, permeado en polvo, lactosa de grado alimenticio y WPC (concentrado de proteínas de suero, por sus siglas en inglés: Whey Protein Concentrate) (Terán y col., 2013). El primer paso en la mayoría de los procesos para la valorización de suero de queso consiste en la recuperación de la fracción proteica, generalmente mediante ultrafiltración, para producir WPC, al mismo tiempo se genera un gran volumen de permeado de suero de queso que es un producto rico en

lactosa (Guimarães y col., 2010). La producción de suero de queso en polvo es la forma más elemental de agregar valor al mismo y es una buena alternativa a la utilización del suero líquido para alimentación animal (Peters, 2005).

El desarrollo de medios de cultivo a partir de suero de queso, que sean simples, robustos, escalables y de bajo costo, permitiría una producción económicamente más ventajosa de biomasa de bacterias ácido lácticas (BAL) para diversas aplicaciones en alimentos, debido a la importancia que tienen hoy las BAL como suplementos probióticos y mediante el aprovechamiento de subproductos lácteos como medios de cultivo (Burns y col., 2008 Aguirre-Ezkauriatza y col., 2010) se le daría valor agregado a un producto que es considerado un problema y que sigue siendo subutilizado (Alvares y col., 2010). Una de las etapas críticas para el uso de microorganismos probióticos es su producción a gran escala utilizando medios de cultivos de bajo costo. Como una opción económica para la producción de biomasa de bacterias probióticas, surge la utilización de subproductos lácteos (suero de queso, permeado de suero de queso, suero de ricota) como alternativas al medio comercial existente a escala laboratorio: el caldo MRS.

Las bacterias viables utilizadas en alimentos funcionales producidas a nivel industrial se almacenan y transportan en forma de cultivos congelados o deshidratados. Se prefieren estos últimos sobre las formas congeladas debido a la facilidad de almacenamiento a largo plazo y al transporte sin el uso especializado de equipamiento de alto frío. La liofilización es la principal forma de deshidratación de probióticos para la aplicación en alimentos o productos farmacéuticos. Otros métodos de deshidratación incluyen el secado spray, secado al vacío, secado en lecho fluidizado o una combinación de estas técnicas (Muller y col., 2009). El secado spray es una alternativa de bajo costo frente a la liofilización ya que es relativamente económica y permite la producción de grandes cantidades de células deshidratadas en un proceso continuo (Gardiner y col., 2000; Schuck y col., 2010). Sin embargo, la deshidratación mediante secado spray implica condiciones de proceso más arduas que la liofilización. Esto podría causar, inevitablemente, daño en la membrana e inactivación celular, dependiendo de las

condiciones tecnológicas aplicadas y de la resistencia intrínseca de la cepa utilizada. La aplicación práctica de la liofilización para BAL, en comparación con el secado spray, sugiere que el primero es adecuado para casi todas las cepas de BAL, mientras que la viabilidad frente al secado spray parece ser mucho más dependiente de cada cepa (Lian y col., 2002; Corcoran y col., 2004; Ananta y col., 2005; Páez y col., 2012). En particular, en la Argentina, numerosas industrias lácteas poseen infraestructura para llevar a cabo el secado spray, esta fortaleza podría ser explotada para la producción local de cultivos probióticos en el futuro. Además, la liofilización aún no es una tecnología común a escala industrial para BAL en nuestro país. Sumado a la reducción de costos, en ciertos casos se puede observar hasta un aumento de la capacidad funcional de los cultivos probióticos deshidratados en comparación con los cultivos frescos (Páez y col., 2013).

El equipo Mini Spray Dryer B-290 de Büchi (Flawil, Suiza) es un instrumento a escala laboratorio para llevar a cabo los procesos de secado por pulverización desde 30 mL y hasta 1 L de agua o solvente orgánico por hora. Este equipo tiene la capacidad de generar partículas de 2 a 25 micrones. El tiempo de residencia del aire de secado dentro de la cámara de pulverización es de aproximadamente 1,5 s. La colecta del polvo se realiza en un ciclón, que está revestido internamente con una película antiestática delgada para reducir la adherencia del polvo a la pared de vidrio. La separación funciona mediante fuerzas centrífugas en virtud de la inercia de las partículas sólidas.

Las principales variables del proceso de secado por atomización son:

- Caudal de alimentación de producto. El caudal de entrada del líquido a atomizar se regula por medio de una bomba peristáltica, en el caso de una boquilla de dos fluidos. Este caudal afecta a la atomización.
- Caudal de aire de atomización. Este aire es suministrado por un compresor. Pasa por una serie de filtros y se regula atendiendo a la lectura de un rotámetro que indica el caudal de aire utilizado para el atomizado.
- Temperatura y humedad del aire de entrada al cilindro o cámara de atomización. Esta temperatura se puede controlar mediante la resistencia eléctrica del equipo.

- Caudal de aire de secado. El caudal de aire de secado indica la cantidad de aire que entra en el cilindro de pulverización para realizar el secado. El caudal real depende de la pérdida de presión del conjunto del sistema.
- Temperatura de salida. Este parámetro será determinado por la combinación de las variables mencionadas.

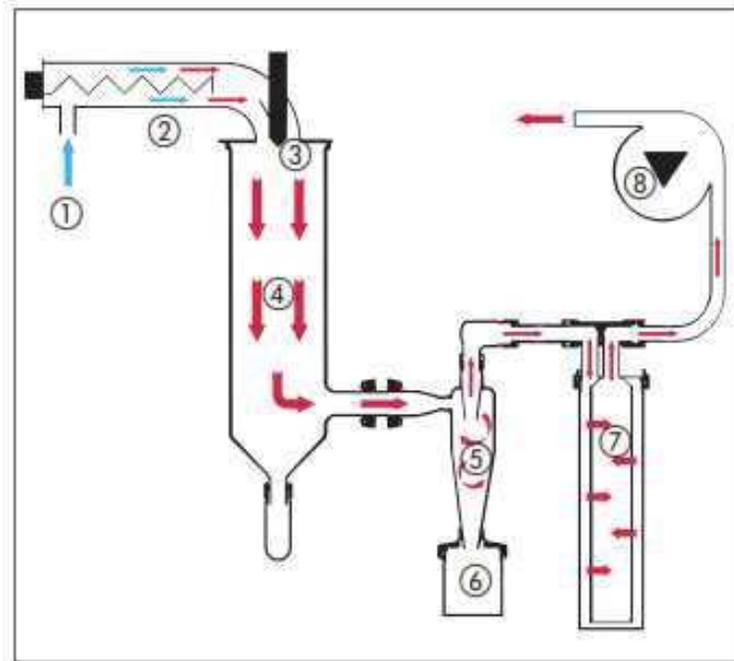
El secadero spray a escala laboratorio Mini Spray Dryer Büchi B-290 instalado en el Laboratorio de Calidad de Leche del INTA EEA Rafaela fue utilizado en este trabajo para llevar a cabo la deshidratación de las bacterias probióticas a escala laboratorio. El mismo se observa en la Figura 2 y los diferentes componentes del mismo, en el diagrama de la Figura 3.



Figura 2: Mini Spray Dryer Büchi B-290

El Mini Spray Dryer B-290 funciona según el principio de flujo paralelo, es decir, el producto pulverizado y el aire seco se desplazan en el mismo sentido. Las suspensiones

celulares son atomizadas y se pulverizan en la cámara de secado mediante el uso de una boquilla de dos fluidos. Esta tecnología permite un secado casi instantáneo.



- 1- Boca de aspiración (filtro de entrada de aire).
- 2- Calefacción eléctrica.
- 3- Entrada de la corriente de aire estabilizada en la cámara de secado.
- 4- Cilindro o cámara de pulverización.
- 5- Ciclón para separar el producto de la corriente de aire.
- 6- Recipiente para la colecta del producto deshidratado.
- 7- Filtro de salida de aire y polvos finos.
- 8- Aspirador para generar la corriente de aire.

Figura 3: Componentes del Mini Spray Dryer Büchi B-290.

OBJETIVO.

El objetivo de este capítulo fue estudiar la utilidad de subproductos lácteos (suero de queso, suero ricota y permeado de suero) para la producción de biomasa de BAL autóctonas con potencial probiótico, y la capacidad del suero de queso para ser utilizado como termoprotector durante el secado spray.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Cepas y condiciones de cultivo.

Se emplearon cepas aisladas de heces de neonatos santafesinos (Vinderola y col., 2008). Los aislamientos utilizados habían sido identificados por métodos moleculares (secuenciación parcial del gen 16s ARN) como *L. paracasei* Jp1, *L. rhamnosus* 64 y *L. gasseri* 37, los cuales presentaron potencial probiótico *in vivo*, en relación a la capacidad de promover las defensas intestinales mediadas por IgA en ratones (Gregoret y col., 2013). Las cepas se mantuvieron congeladas a -70°C en caldo MRS (Biokar, Beauvais, Francia) adicionado con 18 % (v/v) de glicerol (Cicarelli, Buenos Aires, Argentina) en la colección de cultivos del INLAIN. Previo a su uso las cepas fueron repicadas al menos dos veces en caldo MRS durante 16 h a 37°C en aerobiosis.

2.2 Desarrollo en medios de cultivos formulados y en medios lácteos.

Se utilizaron dos tipos de medios de cultivo: sintéticos y lácteos. Los medios sintéticos se prepararon como diferentes versiones simplificadas del medio de cultivo comercial MRS (Tabla 1), llamados de aquí en adelante *medios de cultivo formulados*. Se utilizaron ingredientes de proveedores locales (peptona de caseína, peptona de carne y extracto de levadura de Microquin S.A. (Santa Fe, Argentina) y el resto de los componentes de Cicarelli S.A. (Santa Fe, Argentina). Los medios formulados se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min. Las variantes estudiadas incluyeron una reducción de nutrientes en comparación con MRS, la glucosa como única fuente de carbono, el aumento o reducción de glucosa, peptona de caseína, peptona de carne, o

extracto de levadura (Tabla 1). En cuanto a los medios lácteos, el suero de queso se obtuvo de la elaboración de queso fresco en la planta piloto del INTA EEA Rafaela, el suero de ricota fue proporcionado por la empresa Vila S.A.C.I. (Lácteos Aurora) (Vila, Santa Fe) y el permeado fresco por Saputo S.A. (Rafaela, Santa Fe). La características fisicoquímicas de los medios lácteos se muestran en la Tabla 2 y se determinaron mediante procedimientos estándares: grasa (Federación Internacional de Lechería, IDF, 1987a); proteína total (IDF, 2001); sólidos totales (IDF, 1987b); cenizas (AOAC, 1995) y lactosa por diferencia.

Tabla 1: Composición (g/100 mL) de medios de cultivo formulados para la producción de biomasa de lactobacilos probióticos.

Medio	PCas	PCar	EL	G	L	Tw 80 (μ l)	K ₂ HPO ₄	C	Observación
M0	0,75	0,75	0,75	0,6	0,4	50	0,2	0,05	Reducido en nutrientes comparado con MRS.
M1	0,75	0,75	0,75	1		50	0,2	0,05	Glucosa como única fuente de carbono.
M2	0,75	0,75	0,75	2		50	0,2	0,05	Enriquecido en glucosa.
M3	0,5	0,75	0,75	2		50	0,2	0,05	Reducido en peptona de caseína.
M4	0,75	0,5	0,75	2		50	0,2	0,05	Reducido en peptona de carne.
M5	0,75	0,75	0,5	2		50	0,2	0,05	Reducido en extracto de levadura.
MRS	Composición (g/100 mL): peptona de caseína (1), extracto de carne (1), extracto de levadura (0,5), glucosa (2), Tween 80 (108 μ l), K ₂ HPO ₄ (0,2) acetato de sodio (0,5), citrato de amonio (0,2), sulfato de magnesio (0,02), sulfato de manganeso (0,005).								
PCas: peptona de caseína, PCar: peptona de carne, EL: extracto de levadura, G: glucosa, L: lactosa, Tw80: Tween 80, C: Cisteína.									

El suero de ricota y el permeado de suero se trataron en autoclave a 121°C durante 15 min. Para evitar la precipitación de las proteínas, el suero de queso se trató

térmicamente en autoclave a 100°C durante 30 min (vapor fluente). Se realizó una evaluación microbiológica de rutina (coliformes totales, microorganismos aerobios mesófilos, hongos y levaduras), con el fin de confirmar la inactivación microbiana después del tratamiento térmico.

Como procedimiento estándar, las cepas en estudio se reactivaron a partir de los stocks congelados y se realizaron dos repiques sucesivos (16 h, 37°C, aerobiosis) en caldo MRS (Biokar, Beauvais, Francia) previo a su utilización. Los cultivos frescos (16 h, 37°C, aerobiosis) de las cepas en caldo MRS, se centrifugaron (6000 x g, 15 min, 5°C), se lavaron dos veces con PBS pH 7,4 (solución salina tamponada con fosfato, por sus siglas en inglés: Phosphate Buffered Saline Solution) y se resuspendieron en PBS. En un ensayo preliminar (donde se evaluó el efecto del agregado de extracto de levadura y glucosa), las suspensiones celulares se inocularon 1% (v/v) a los medios lácteos adicionados con a) 0,3% (p/v) de extracto de levadura (Burns y col., 2008) y b) 0,3% (p/v) de extracto de levadura y 2% (p/v) de glucosa.

Las suspensiones celulares se inocularon 1 % (v/v) en los medios formulados y en los medios lácteos (permeado, suero de queso y suero de ricota) y se incubaron 16 h, 37°C, en aerobiosis. Los recuentos de células viables se realizaron en agar MRS en superficie. Se evaluó la demanda biológica de oxígeno (DBO) en suero de queso, antes y después del desarrollo de *L. rhamnosus* 64, por métodos estándares (APHA, 1998) en el Laboratorio de Química de la Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Rafaela, Rafaela, Santa Fe, Argentina.

Tabla 2: Composición (g/100 mL) y pH de los subproductos lácteos utilizados.

	Suero de ricota	Permeado	Suero de queso
Sólidos totales	5,39	8,92	6,04
Cenizas	0,51	0,97	0,45
Materia grasa	0,03	0,02	0,39
Proteínas totales	0,39	0,46	0,82
Lactosa	4,46	7,47	4,38
pH inicial	5,67	6,1	6,2

2.2.1 UTILIZACIÓN DE SUERO DE QUESO COMO MEDIO DE CULTIVO EN FERMENTADOR.

El desarrollo de *L. rhamnosus* 64 se evaluó durante la fermentación en cultivo batch (2 L, Biostat A plus, Sartorius, Alemania) en suero de queso (Arla Foods, Porteña, Córdoba, Argentina) reconstituído al 7% (p/v), a 37°C, agitación 200 rpm, con y sin burbujeo de CO₂ (0,2 L/min). Durante la fermentación se midió oxígeno disuelto (sensor Oxiferm Hamilton). Los fermentadores fueron inoculados 1% (v/v) con un cultivo *overnight* en MRS lavado 2 veces y resuspendido en PBS. El pH se mantuvo constante (pH 6) con el agregado automático de NaOH (6 N). Para el recuento de células viables se realizaron diluciones decimales en agua de peptona 0,1% (p/v), las cuales se sembraron en superficie en agar MRS. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h en aerobiosis.

2.3 Optimización de secado spray de suero de queso.

Para optimizar el secado de suero de queso - almidón se utilizó la metodología de superficie de respuesta, la cual es una combinación de técnicas matemáticas y estadísticas usadas para desarrollar y optimizar procesos, entre otras aplicaciones. Esta metodología

permite evaluar el comportamiento de varios factores, incluso la presencia de interacciones complejas entre ellos (Shokri y col., 2015). Se prepararon soluciones de suero de queso (Arla Foods, Porteña, Córdoba, Argentina) y almidón (Glutal S.A., Buenos Aires, Argentina) (20% de sólidos totales, relación 1:1) y se autoclavaron a 121°C durante 15 min. Las soluciones de suero de queso - almidón se deshidrataron en un secadero spray (Mini Secadero Spray Büchi B-290, Flawil, Suiza). Los parámetros de secado se optimizaron mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM), utilizando un diseño central compuesto (DCC) (Tabla 3). El DCC utilizado tiene dos niveles, y requiere menos experimentos que otros diseños (Mehrabani y col., 2010). Las variables independientes utilizadas fueron el flujo de aire y la temperatura de entrada, usando dos niveles para cada uno de ellas. Las variables de salida consideradas para la optimización fueron humedad (menos del 5%) y temperatura de salida (< 85°C), la cual garantizaría la viabilidad de los probióticos (Ananta y col., 2005). Se llevaron a cabo tres repeticiones para los puntos centrales.

Tabla 3: Diseño central compuesto utilizado para optimizar el secado spray de una solución de suero de queso – almidón (10% p/v-10% p/v) mediante la metodología de superficie de respuesta.

Variables Independientes	Variable	Niveles de las variables		
		1	0	-1
Flujo de aire (mm)	X1	50	40	30
Temperatura de entrada (°C)	X2	160	145	130

mm de columna: 50 mm equivalente a 601 L/h; 40 mm a 473 L/h; y 30 mm a 357 L/h.

2.4 Secado spray de lactobacilos probióticos en suero de queso - almidón y leche descremada - almidón.

Se obtuvieron cultivos de las 3 cepas en estudio en el medio de cultivo formulado M2, la biomasa obtenida con cada cepa se concentró por centrifugación (6000 x g, 15 min, 5°C), se lavó dos veces con PBS y se resuspendió en un volumen 10 veces menor de solución de suero de queso - almidón (10%-10% p/v), o en leche descremada - almidón (10%-10% p/v). Las suspensiones celulares se deshidrataron por secado spray. Las condiciones de secado para leche descremada - almidón fueron: temperatura entrada (TE) 170°C, temperatura de salida (TS) 85°C y un flujo de aire (FA) de 600 L/h (Paez y col., 2012) y para las suspensiones de suero de queso - almidón TE: 150°C, TS: 80°C y FA: 357 L/h. Se realizaron tres repeticiones independientes para cada cepa. Los cultivos deshidratados obtenidos fueron envasados al vacío en muestras individuales de 10 g y se almacenaron durante 6 meses a 5°C. La humedad residual (% p/p) se determinó por triplicado a 101° ± 1°C durante 24 h (IDF, 1993). Los recuentos de células viables se realizaron en agar MRS (37°C, 48 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 restaurar la solución a las condiciones anteriores al secado spray y poder comparar los recuentos en UFC/mL.

2.5 Análisis estadístico.

Los resultados de los recuentos de células viables se transformaron a log UFC/mL y se expresaron como media ± desviación standard o como diferencia logarítmica, de al menos tres experimentos independientes en cada ensayo. Los datos de desarrollo de *L. rhamnosus* 64 en los medios de cultivo, los datos de supervivencia al secado spray y la viabilidad durante el almacenamiento se analizaron estadísticamente utilizando un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos para determinar las

diferencias en el desarrollo de las cepas, en los medios de cultivo, o en la supervivencia al secado y durante el almacenamiento. Las cepas (3 niveles) y los medios de cultivo (7 niveles para el medio formulado y 4 niveles para los medios lácteos incluyendo MRS como referencia) se consideraron como factores en el primer diseño mientras que las cepas (3 niveles) y las soluciones de secado (2 niveles) se consideraron como factores en el segundo diseño. El análisis de varianza y la mínima diferencia significativa (LSD) se utilizaron para poner a prueba los factores significativos y comparar los tratamientos, respectivamente, con un nivel de error del 5%.

Los parámetros de secado se optimizaron mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM), utilizando un diseño central compuesto (DCC) El procedimiento de optimización es secuencial, por lo cual el primer objetivo consiste en establecer experimentalmente una aproximación apropiada para la función que los modela. En la primera etapa se ajustó un modelo de primer orden.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \varepsilon$$

Donde:

Y es la variable respuesta

β_0 y β_i corresponden a los coeficientes de regresión

ε es el término de error.

Para este modelo se estimó el error experimental (*lack of fit*) a fin de tener una herramienta para determinar el ajuste del modelo planteado. En caso de rechazar la hipótesis de ajuste, se planteó un modelo que contempló un modelo cuadrático o de segundo orden.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{j=2}^k \sum_{i=1}^{j-1} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

El ajuste de los modelos se hizo por la metodología de los mínimos cuadrados, y el riesgo de error asumido fue de $\alpha=0,05$. Se utilizaron los paquetes estadísticos R (3.1.2) y SAS 9.2.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Desarrollo de lactobacilos probióticos en medios formulados y lácteos.

La creciente demanda de probióticos y la diversificación en nuevos alimentos genera un desafío para la industria: producir de forma económica grandes cantidades de cultivos viables y en formatos de conservación estables que soporten y estimulen el crecimiento del mercado (Muller y col., 2009). Una combinación de medios de cultivo de bajo costo y un menor costo operativo con tecnologías de deshidratación ampliamente disponibles, tales como el secado spray, sería probablemente bienvenida por la industria alimentaria para sostener y ampliar el mercado de probióticos y potenciar los desarrollos locales en base a cepas autóctonas y tecnologías localmente disponibles (Sybesma y col., 2015).

Teniendo en cuenta la posibilidad de producción a escala industrial de estas cepas en el futuro, los medios formulados (Tabla 1) fueron una alternativa económica al MRS para la producción de biomasa de bacterias probióticas. El análisis de costos (datos no mostrados) de los medios de cultivo formulados, permitió determinar que sus costos fueron de aproximadamente un tercio respecto al MRS comercial. El comportamiento de las cepas fue diferente según el medio de cultivo formulado, se observó una interacción medio de cultivo–cepa que fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Los seis medios evaluados (M0 a M5) fueron eficaces, tanto para el desarrollo de *L. paracasei* Jp1 como para *L. rhamnosus* 64, para los cuales no hubo diferencias significativas en los recuentos de células viables ($p > 0,05$) en comparación con los alcanzados en MRS (Tabla 4). Sin embargo, *L. gasseri* 37 mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en todos los medios formulados en comparación con el caldo MRS comercial. En principio, esta cepa resultó ser más exigente nutricionalmente y el medio de cultivo formulado tuvo que ser fortalecido con nutrientes (composición mostrada en la parte inferior de la Tabla 4) para lograr un mejor desarrollo ($9,16 \pm 0,21$ log UFC/mL) comparable con el obtenido en MRS ($9,23 \pm 21$ log UFC /mL).

La capacidad de desarrollo de las cepas también se evaluó en subproductos lácteos (Fig. 4). La adición de glucosa 2% (p/v) y/o extracto de levadura 0,3% (p/v) no tuvo efecto significativo en el desarrollo de las cepas en estudio, en ninguno de los medios lácteos evaluados (datos no mostrados).

El desarrollo de *L. gasseri* 37 en MRS y suero de queso no presentó diferencias significativas. Sin embargo, en suero ricota y permeado de suero fue significativamente menor (< 1 orden log) comparado con MRS. Para *L. paracasei* Jp1 el desarrollo no fue satisfactorio en permeado de suero. De hecho, el permeado de suero había sido considerado como una fuente nutricionalmente pobre para el crecimiento de BAL (Parente y Zottola, 1991). Sin embargo, para *L. rhamnosus* 64 no se observaron diferencias significativas entre los medios de cultivo evaluados (Tabla 5). En este sentido, esta cepa mostró una versatilidad tecnológica interesante, principalmente desde un punto de vista industrial.

Tabla 4: Recuentos de lactobacilos probióticos (37°C, 16 h, aerobiosis) en MRS comparado con los medios formulados.

Medio de cultivo	Recuentos (log UFC/mL ± SD)		
	<i>L. paracasei</i> Jp1	<i>L. gasseri</i> 37*	<i>L. rhamnosus</i> 64
MRS	9,26 ± 0,18 ^a	9,23 ± 0,21 ^a	8,91 ± 0,19 ^a
M0	9,11 ± 0,10 ^a	8,32 ± 0,10 ^b	8,72 ± 0,20 ^a
M1	9,13 ± 0,21 ^a	8,43 ± 0,11 ^b	8,55 ± 0,17 ^a
M2	9,09 ± 0,07 ^a	8,85 ± 0,14 ^b	8,73 ± 0,11 ^a
M3	9,04 ± 0,16 ^a	8,81 ± 0,19 ^b	8,55 ± 0,15 ^a
M4	9,08 ± 0,13 ^a	8,75 ± 0,19 ^b	8,59 ± 0,13 ^a
M5	9,04 ± 0,16 ^a	8,70 ± 0,14 ^b	8,44 ± 0,24 ^a

Los valores en columnas con diferentes superíndices (a, b) son significativamente diferentes (p < 0,05).

* Composición del medio formulado, suplementado para la producción de biomasa de esta cepa: (g/100 mL): peptona de caseína (0,75), extracto de carne (0,75), extracto de levadura (0,75), glucosa (1), Tween 80 (50 μ L), K_2HPO_4 (0,2), acetato de sodio (0,5), citrato de amonio (0,2), sulfato de magnesio (0,02), sulfato de manganeso (0,005).

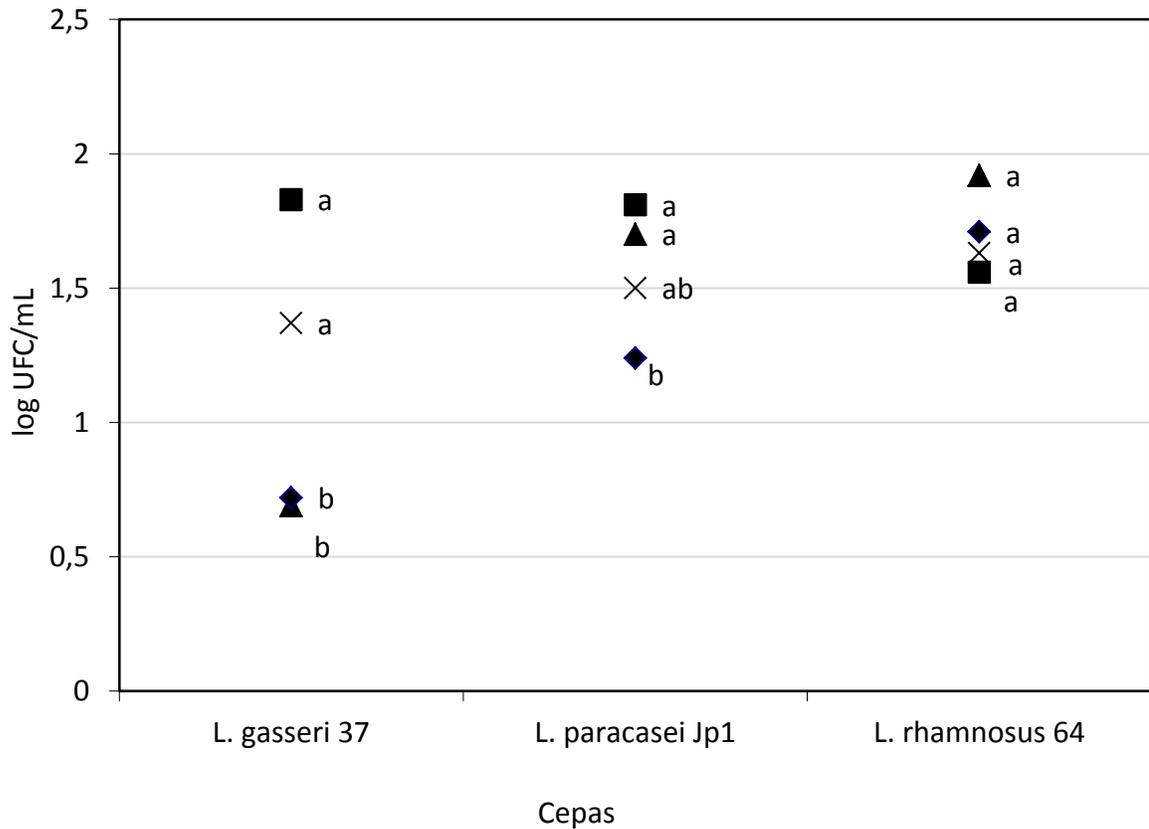


Figura 4: Desarrollo (log UFC/mL) de *L. gasseri* 37, *L. paracasei* Jp1 y *L. rhamnosus* 64 en MRS (■), permeado de suero (▲), suero de queso (x) y suero de ricota (◆). Los valores se calcularon como la diferencia en los recuentos de células (UFC/mL) después y antes del desarrollo (37°C, 16 h, aerobiosis) en el correspondiente medio. Diferentes letras en los símbolos para una misma cepa indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 5: Recuento de células viables (log UFC/mL \pm SD) alcanzados por cada cepa en cada medio lácteo, comparado con caldo MRS comercial. Diferentes letras en los símbolos para una misma cepa indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

	<i>L. paracasei</i> Jp1	<i>L. rhamnosus</i> 64	<i>L. gasseri</i> 37
MRS	8,95 \pm 0,33 ^a	8,67 \pm 0,09 ^a	9,08 \pm 0,23 ^a
Permeado	8,71 \pm 0,18 ^a	8,92 \pm 0,10 ^a	7,83 \pm 0,57 ^b
Suero de queso	8,63 \pm 0,20 ^{ab}	9,01 \pm 0,10 ^a	8,36 \pm 0,21 ^a
Suero de ricota	8,15 \pm 0,21 ^b	8,70 \pm 0,03 ^a	7,63 \pm 0,19 ^b

3.1.1 UTILIZACIÓN DE SUERO DE QUESO COMO MEDIO DE CULTIVO.

Debido a la capacidad de *L. rhamnosus* 64 de desarrollar en todos los medios lácteos evaluados, se utilizó esta cepa para continuar los estudios de producción de biomasa en fermentador utilizando medios lácteos como medio de cultivo. Existen en la actualidad numerosos trabajos donde se utilizaron estos medios como sustrato para la producción de bacterias lácticas y probióticas, aunque hay más publicaciones utilizando suero de queso (Pérez Guerra y col., 2007; Burns y col., 2008; Fajardo Bernárdez y col., 2008; Aguirre-Ezkauriatza y col., 2010; Bruschi Brinques y col., 2010; Jantzen y col., 2013) en comparación con los pocos informes donde se ha utilizado suero ricota (Maragkoudakis y col., 2010; Maragkoudakis y col., 2016) o permeado de suero (Parente y Zottola, 1991; Marhamatizadeh y col., 2012; Hugo y col. 2016; Trigueros y col., 2016).

Teniendo en cuenta que el suero de queso es el subproducto principal de la industria láctea (De Castro Cislighi y col., 2012) y que el desarrollo de las cepas fue satisfactorio en este medio, este producto fue elegido para realizar los estudios siguientes sobre su papel como termoprotector para el secado spray. Se evaluó en fermentaciones batch la producción de biomasa de *L. rhamnosus* 64, utilizando suero de queso 7% (p/v) como medio de cultivo. En la Figura 5, se observa la curva de crecimiento, a pH 6 con

agitación de 200 rpm, con burbujeo de CO₂, logrando hacia las 24 h de fermentación (24 h) un nivel de células viables de $9,32 \pm 0,12$ log UFC/mL. Para evaluar el efecto del burbujeo de CO₂ (0,2 L/min), se realizaron fermentaciones con y sin burbujeo de este gas (Fig. 6). En la fermentación sin CO₂, a las 5 h de cultivo comenzó a disminuir el porcentaje de oxígeno disuelto (Fig. 7), pero como se observa en la Figura 6 la velocidad de crecimiento de la cepa fue mayor con burbujeo de CO₂.

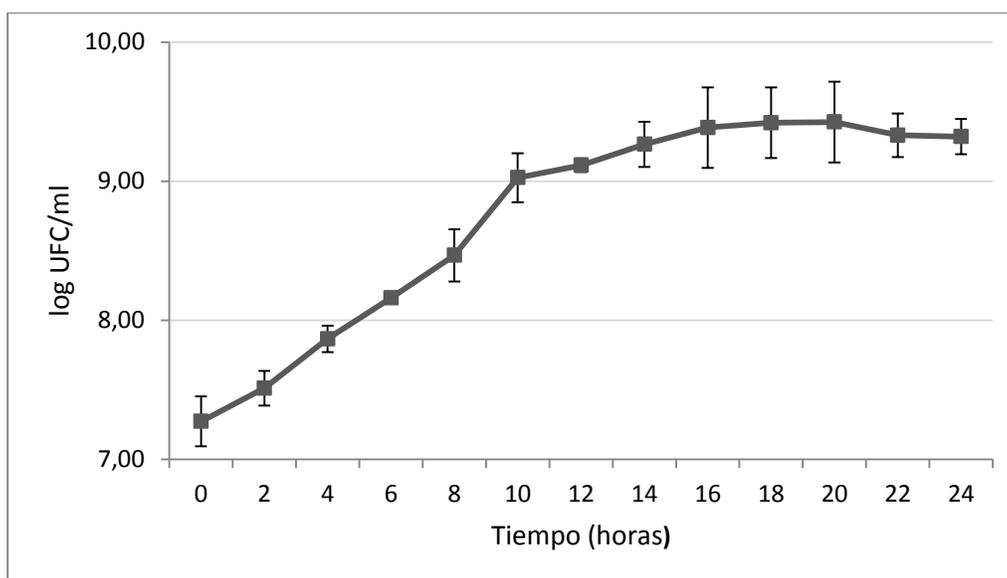


Figura 5: Curva de desarrollo de *L. rhamnosus* 64 en suero de queso (7% p/v), a pH 6 constante, agitación 200 rpm y con burbujeo de CO₂

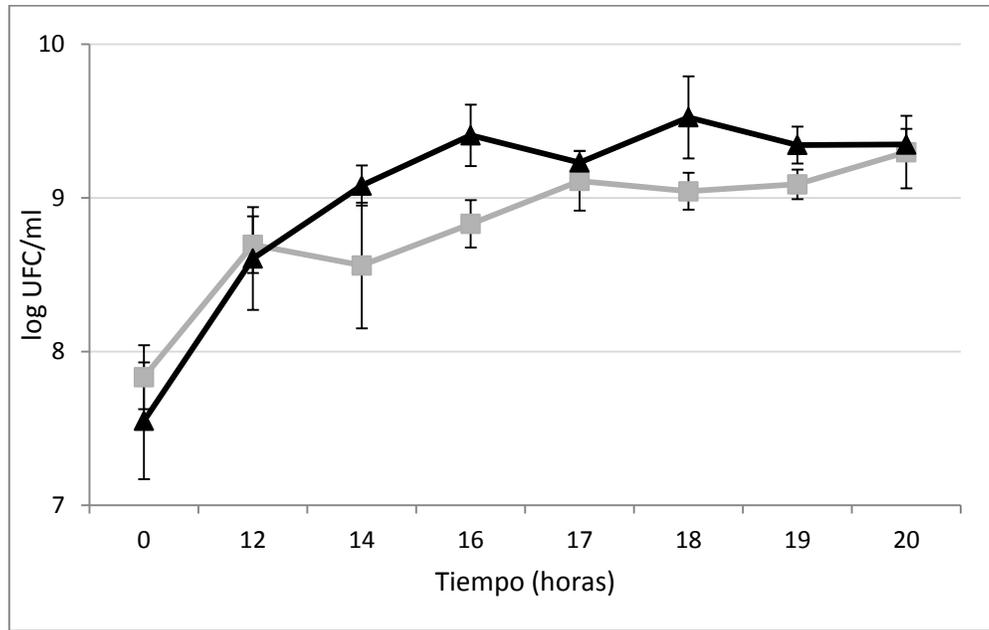


Figura 6: Desarrollo de *L. rhamnosus* 64 en suero de queso (7% solidos totales) a pH 6 constante, con (▲) y sin burbujeo (■) de CO₂.

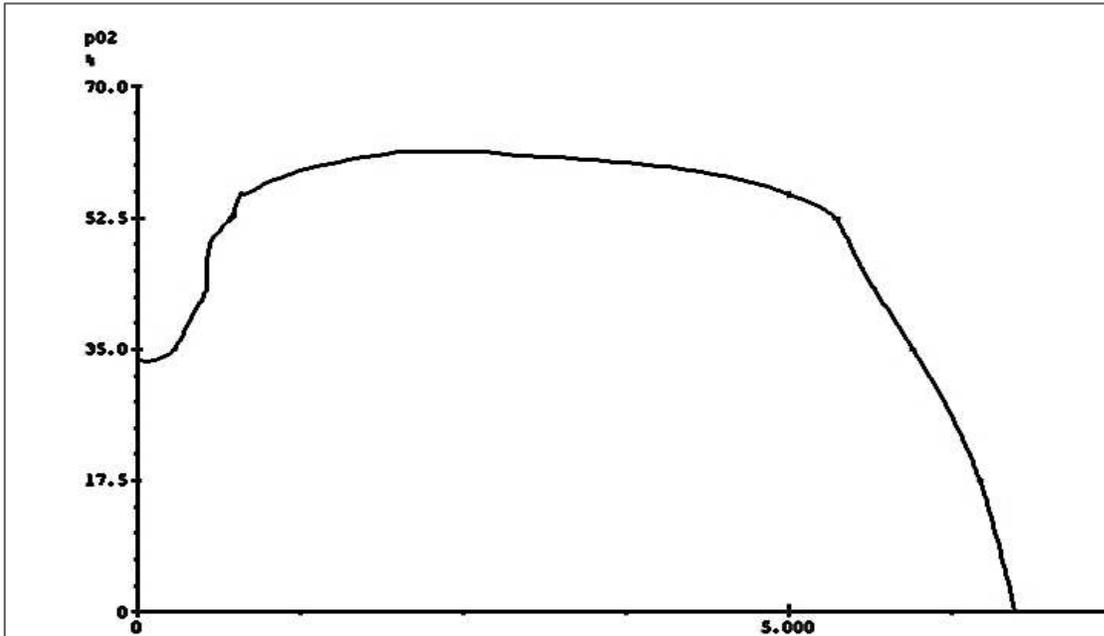


Figura 7: Evolución de oxígeno disuelto durante el desarrollo de *L. rhamnosus* 64 en suero de queso (7% p/v), a pH 6 constante, agitación 200 rpm sin burbujeo de CO₂.

En cuanto a la demanda biológica de oxígeno (DBO) de suero de queso, el desarrollo de *L. rhamnosus* 64 redujo este valor de 65500 ± 3540 ppm a 33062 ± 4860 ppm. Este 50% de reducción en DBO contribuiría a una reducción significativa de la carga contaminante del suero de queso cuando es utilizado como medio de cultivo para producir biomasa de microorganismos probióticos, facilitando la deposición final de efluentes. Cabe destacar que el suero de queso utilizado en este estudio presentó una DBO inicial más alta que la comúnmente reportada como usual para este producto (30000-50000 ppm, según Siso, 1996).

3.2 Optimización del secado spray de suero de queso – almidón.

Pocos estudios se dedicaron a la optimización de la deshidratación de la matriz de secado antes de la incorporación de células viables para su deshidratación. En ensayos previos (donde se evaluaron las variables para definir el modelo de superficie de respuesta), no fue posible deshidratar por secado spray el suero de queso como único ingrediente bajo las condiciones utilizadas (donde se prioriza una baja temperatura de salida para garantizar la viabilidad celular), debido a que está compuesto mayoritariamente por lactosa, un componente crítico a la hora de realizar este proceso debido a su baja temperatura de transición vítrea (T_g) y a su naturaleza altamente higroscópica. El secado spray de ciertos alimentos con alto contenido de grasas y azúcares es técnicamente difícil, causando altos costos operacionales y bajo rendimiento del producto final, dando lugar a un producto pegajoso (fenómeno denominado normalmente en la bibliografía como stickiness). Este fenómeno está relacionado con la baja temperatura de transición vítrea presente en estos tipos de productos, que post secado muestran una interacción superior con el agua (aumento de la higroscopicidad), mayor cohesión entre las partículas y una adhesión superior. Por lo tanto, pueden adherirse a las paredes de la cámara durante el secado, lo que lleva a problemas de rendimiento y de funcionamiento (Finney y col., 2002). La T_g es la temperatura crítica a partir de la cual una sustancia en estado vítreo comienza a tener propiedades de fluido. La temperatura de transición vítrea es específica para cada tipo de material y el fenómeno de pegajosidad

(stickiness) ocurre generalmente a 10 - 20°C por encima de la Tg del componente utilizado. Por esta razón se adicionan sustancias que aumentan la Tg y por lo tanto se aumenta la temperatura en donde ocurre el fenómeno de pegajosidad (Moreira y col., 2009). La Tg específica de polvos que contienen azúcares juega un papel importante en la estabilidad de los microorganismos deshidratados y la calidad organoléptica de los polvos, y esta depende además de la temperatura de almacenamiento y del contenido de humedad del polvo. La alta viscosidad de los cristales de azúcar por debajo o alrededor de su temperatura de transición vítrea retarda la movilidad molecular y la reactividad, resultando en un efecto estabilizante de los sistemas biológicos (Buitink y col., 2000). Respecto al uso de agentes protectores, los azúcares son utilizados normalmente ya que ayudan a aumentar la temperatura de transición vítrea (Tripathi y Giri, 2014). Los agentes de encapsulación utilizados en el secado por pulverización pueden ser carbohidratos (almidón, maltodextrina, dextranos, sacarosa, celulosa y derivados), gomas (goma arábica, agar, carragenano, etc.), lípidos (cera, parafina, diglicéridos) y proteínas (gluten, caseína, albúminas, péptidos, proteínas de suero). De estos, los polímeros de alto peso molecular y con alta temperatura de transición vítrea (Tg) son los más utilizados, tales como maltodextrina, goma arábica y almidón modificado (Cano-Chauca y col., 2011).

En este trabajo, y con el objetivo de aumentar la Tg se adicionó almidón, el cual además de evitar la cristalización de la lactosa actuaría como termoprotector de las BAL, ya que por su contenido en amilosa se puede unir a las membranas celulares bacterianas y aumentar la tasa de supervivencia tras el paso a través del tracto gastrointestinal (Crittenden y col., 2001; Goderska y Czarnecki, 2008), mejorando además su conservación durante el proceso de secado y almacenamiento (Páez y col., 2012).

En este diseño de superficie de respuesta las variables de entrada utilizadas fueron flujo de aire y temperatura, mientras que las variables de respuesta o de salida fueron humedad y temperatura de salida. Se estableció un valor máximo admisible de humedad del 5% (p/p), ya que una deshidratación insuficiente (humedad > 5% p/p) o demasiado exhaustiva (humedad < 2,5% p/p) provoca la inactivación bacteriana (Zayed y Roos, 2004). Se estableció una temperatura de salida máxima admisible de 85°C para lograr una

viabilidad celular adecuada (Peighambardoust y col., 2011). Como resultado de la superficie de respuesta, el modelo ajustado obtenido para la humedad fue: $H = 11,02 - 0,05 \times TE + 0,08 \times FA$, donde H es la humedad, TE es la temperatura de entrada y FA es el flujo de aire. Se observa en la Fig. 8-a una tendencia, la humedad disminuyó a medida que la temperatura de entrada aumentó, el flujo de aire se comportó de manera inversa, la humedad aumentó con el aumento del flujo de aire.

Para el caso de la temperatura de salida el modelo ajustado obtenido fue: $TS = 4,22 + 0,63 \times TE - 0,28 \times FA$ ($p < 0,05$). De acuerdo al modelo aplicado, el secado spray de suero de queso - almidón puede llevarse a cabo con una TE de 145-155°C y un FA de 30 mm (357 L/h), logrando una TS menor a 85°C y la obtención de un polvo con humedad de 4-5% (p/p). En la presente configuración del equipo utilizado, si el flujo de aire es menor a 30 mm (357 L/h), el producto puede no ser deshidratado correctamente mientras una temperatura de entrada entre 145°C y 155°C dió lugar a un valor de humedad adecuado (4-5% p/p). Un aumento de temperatura de salida (Gardiner y col., 2000) y humedad (Jantzen y col., 2013) se relacionó con menores tasas de supervivencia de microorganismos probióticos. En la Figura 8-b se observa que la temperatura de salida es una respuesta directa de la temperatura de entrada. En relación al rendimiento, se recuperaron del ciclón aproximadamente 4-5 g de polvo cada 100 mL de solución (20% de sólidos totales iniciales). Este rendimiento puede parecer *a priori* bajo, sin embargo, debe tenerse en cuenta que el equipo de secado spray utilizado opera en modo batch (por lotes o discontinuo), mientras que el secado spray a mayor escala opera de manera continua. Por lo tanto, la pegajosidad del polvo, debido al contenido de lactosa, determina una masa de sólidos exánime o muerta, que podría ser significativa en el secado de pequeños volúmenes en modo discontinuo (como este caso), pero que perderá gradualmente importancia durante el secado de mayores volúmenes en un proceso continuo.

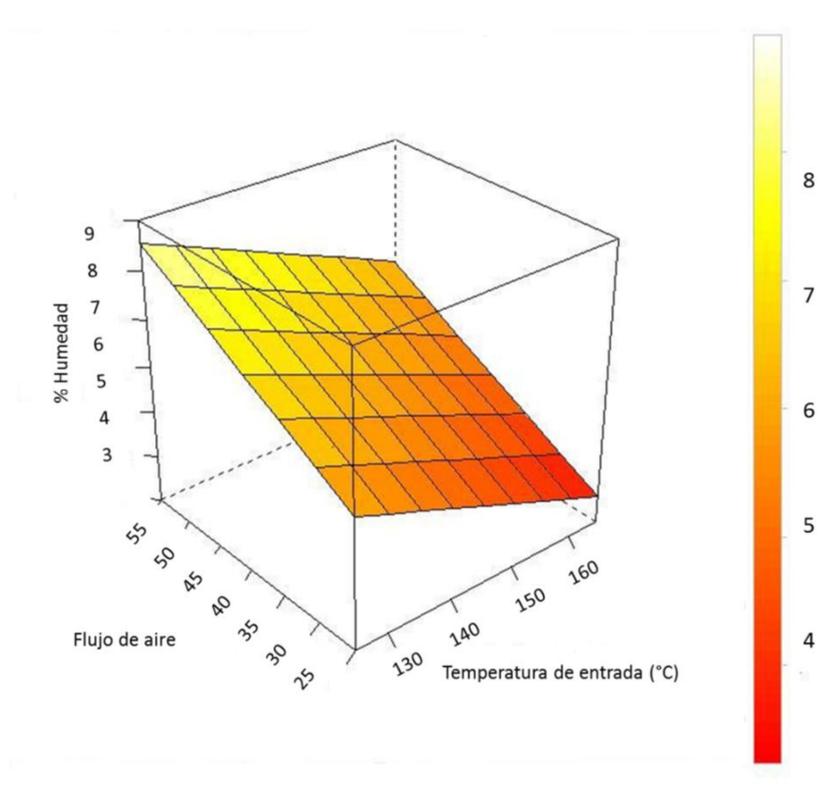


Figura 8-a: Gráfico de superficie de respuesta durante el secado spray de suero de queso – almidón 20% (p/v), donde la variable respuesta es la humedad.

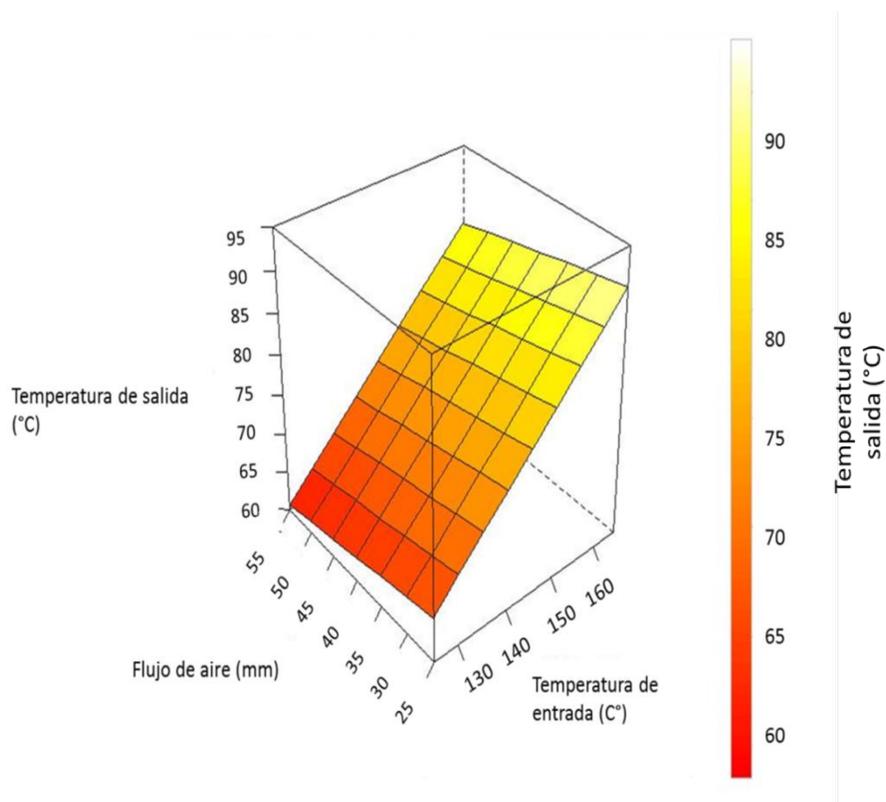


Figura 8-b: Gráfico de superficie de respuesta durante el secado spray de suero de queso – almidón 20% (p/v), donde la variable respuesta es la temperatura de salida.

3.3 Secado spray de lactobacilos probióticos en suero de queso - almidón.

Teniendo en cuenta el área definida como óptima para el secado spray de la solución de suero queso - almidón, las cepas en estudio se deshidrataron usando un flujo de aire de 30 mm (357 L/h) y una temperatura de entrada de 150°C. El empleo de leche descremada - almidón como matriz de secado se utilizó como referencia, ya que según los resultados de Páez y col., (2012), la adición de almidón mejoró las propiedades físicas de los polvos obtenidos (la recuperación desde el ciclón y la manipulación de los mismos), la viabilidad celular después del secado y la resistencia a la digestión gástrica simulada.

Se observaron reducciones significativas en el recuento de células viables después del secado spray para *L. gasseri* 37 en leche descremada - almidón ($p = 0,0013$) y en suero de queso - almidón ($p < 0,0001$). Para *L. paracasei* Jp1 no se observaron diferencias

significativas en los recuentos en leche descremada - almidón pero los recuentos en suero de queso - almidón fueron significativamente menores después del secado ($p = 0,0231$). Por último, el recuento de células viables de *L. rhamnosus* 64 fue significativamente menor ($p = 0,0167$) después de deshidratarlo en leche descremada - almidón, pero no se detectaron diferencias significativas cuando la matriz de secado fue suero de queso - almidón (Fig. 9).

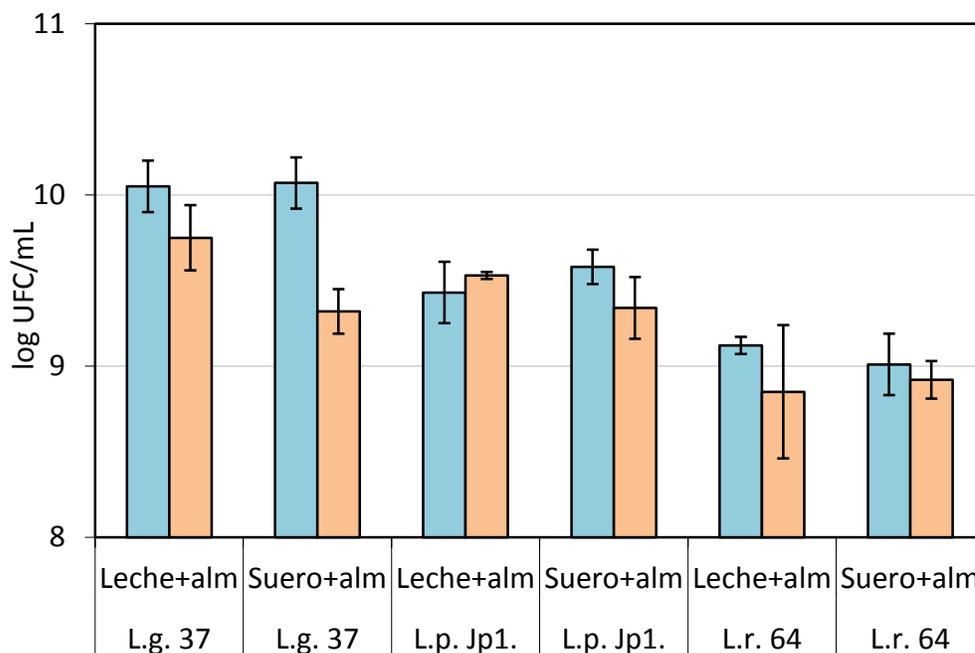


Figura 9: Recuento de células viables de *L. gasseri* 37 (L.g. 37), *L. paracasei* Jp1 (L.p.Jp1) y *L. rhamnosus* 64 (L.r. 64) antes (■) y después (■) del secado spray suero de queso - almidón (10%-10%) y leche descremada - almidón (10%-10%).

Durante el almacenamiento de los cultivos deshidratados a 5°C, la supervivencia fue dependiente de la cepa y de la matriz de secado utilizada (Fig. 10). Durante el segundo mes de almacenamiento, se observó una pérdida en la viabilidad celular de 1,2-1,3 y de 0,4-0,6 órdenes log para *L. gasseri* 37 y *L. paracasei* Jp1, respectivamente, sin diferencias significativas con respecto a la solución de secado utilizada para *L. paracasei* Jp1, pero para *L. gasseri* 37 los recuentos en leche descremada - almidón fueron significativamente

mayores ($p = 0,0457$) que los resultados obtenidos en suero de queso - almidón. Para *L. rhamnosus* 64 la reducción del nivel de células viables en leche descremada - almidón fue de 1 orden log, mientras que en suero de queso fue de 0,5 órdenes logarítmicos. A los 6 meses de almacenamiento, las reducciones en órdenes log fueron de 2,2 y 1,6 para *L. rhamnosus* 64 y *L. paracasei* Jp1, respectivamente, independientemente de la matriz. Para *L. gasseri* 37 las reducciones en el número de células viables fueron de 2,5 y 3,7 órdenes log en leche descremada y suero de queso, respectivamente, siendo estadísticamente diferentes ($p = 0,0006$). No se observaron diferencias significativas en los recuentos de células viables entre leche descremada - almidón y suero de queso - almidón durante el almacenamiento para *L. rhamnosus* 64 y *L. paracasei* Jp1. Sin embargo, para *L. gasseri* 37 los recuentos obtenidos en leche descremada - almidón fueron mayores que en suero de queso - almidón a los 2 ($p = 0,0457$), 4 ($p = 0,0003$), y 6 ($p = 0,0006$) meses de almacenamiento. La supervivencia durante el almacenamiento fue cepa y matriz dependiente, coincidiendo esta observación con lo reportado por Lian y col. (2002) para diferentes cepas de bifidobacterias secadas spray en soluciones al 10% (p/p) de gelatina, goma arábiga y almidón soluble. La mayoría de los trabajos sobre microencapsulación de bacterias probióticas, bifidobacterias y BAL en general, en matrices de secado lácteas, se llevó a cabo utilizando leche descremada como el componente principal del medio termoprotector (Lian y col., 2002; Corcoran y col., 2004; Ananta y col., 2005; Simpson y col., 2005; Golowczyc y col., 2011; Fritzen Freire y col., 2012; Paez y col., 2012).

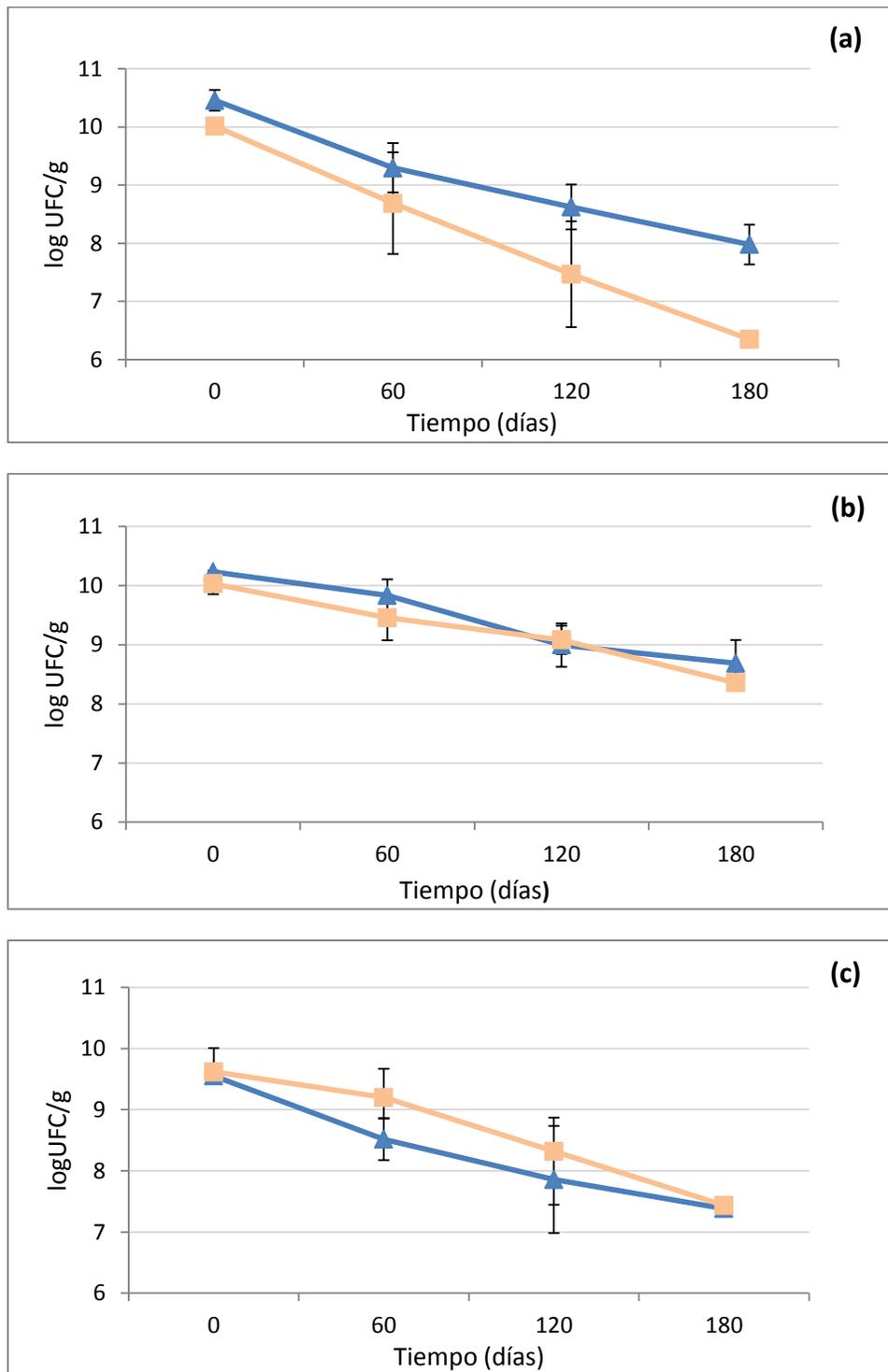


Figura 10: Recuentos de células viables de *L. gasseri* 37 (a), *L. paracasei* Jp1 (b) y *L. rhamnosus* 64 (c) en leche descremada 10% (p/v) - almidón 10% (p/v) (▲) o en suero de queso 10% (p/v) - almidón 10% (p/v) (■) durante el almacenamiento (días) a 5°C.

Otros tipos de materiales utilizados para el secado spray de probióticos son almidón (O'Riordan y col., 2001), acetato oftalato de celulosa (Fávaro-Trindade y Grosso, 2002), suero de manteca (Curda y col., 2006), cacao en polvo (Ricci y col., 2011), suero de queso (De Castro Cislighi y col., 2012; Jantzen y col., 2013) o concentrados de proteína de suero (Rodrigues y col., 2011; Ying y col., 2012; Soukoulis y col., 2013), aislado de proteína de suero de queso (WPI) (Khem Y col., 2015). Hay informes más recientes donde se puede encontrar gelatina, concentrado de proteína de suero (WPC), almidón modificado, maltodextrina, goma arábiga utilizando dos temperaturas de entrada (80°C y 125°C) para microencapsular por secado spray *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* (Arslan y col., 2015). En el trabajo de Rajam y Anandharamakrishnan (2015) se utilizan mezclas de fructoligosacaridos (FOS) con WPI para aumentar la Tg de la solución para encapsular *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422). Otro estudio ha informado el secado spray directo de biomasa de *Lactobacillus reuteri* obtenida utilizando suero de queso como medio de cultivo, obteniendo una pérdida de viabilidad celular de 2 órdenes log, independientemente de la temperatura de salida (Jantzen y col., 2013). Estos antecedentes indican la variedad de materiales y condiciones utilizados para encapsular mediante secado spray y evidencian la ausencia de una única matriz que asegure la supervivencia al proceso de secado.

En particular, *L. rhamnosus* 64 tuvo una pérdida admisible en la viabilidad celular durante el almacenamiento a 5°C durante 2 meses. Excepto en el trabajo publicado por De Castro Cislighi y col., (2012), donde no hubo pérdida en la viabilidad celular a lo largo de los 12 meses de almacenamiento a 4°C, en el resto de los trabajos (Rodrigues y col., 2011; Ying y col., 2012.; Jantzen y col., 2013; Soukoulis y col., 2013) donde el suero de queso o proteínas de suero fueron utilizados como el único o el principal componente de la solución de secado, se observaron 1-2 órdenes log de muerte celular durante los dos primeros meses de almacenamiento a 5°C. Es interesante observar que en el presente trabajo y en los trabajos de Rodrigues y col., (2011), Ying y col., (2012) y Soukoulis y col., (2013), se utilizó una temperatura de salida superior a 75°C, mientras que en los trabajos de De Castro Cislighi y col., (2012) y Jantzen y col., (2013) la temperatura de salida

empleada estuvo por debajo de 65°C. La temperatura de salida podría ser uno de los principales factores a tener en cuenta al utilizar componentes de suero de queso para el secado de cultivos probióticos. Sin embargo, cuanto menor sea la temperatura de salida, mayor será el contenido de humedad (Jantzen y col., 2013).

4. CONCLUSIONES PARCIALES.

El doble uso de suero de queso, como medio de cultivo y como agente termoprotector, es una opción tecnológica innovadora debido a la posibilidad de dar nuevos usos a las grandes cantidades de suero de queso producidas en todo el mundo, al menos contribuyendo de forma parcial a la problemática de su disposición final debido a que se logra bajar la DBO de este sustrato y al mismo tiempo producir biomasa de cultivos de alto valor agregado.

Teniendo en cuenta la capacidad de *L. rhamnosus* 64 de desarrollar en medios de cultivo formulados y en medios lácteos, la resistencia al secado en la solución de suero de queso - almidón y la admisible pérdida de viabilidad celular durante el almacenamiento a corto plazo, esta cepa parecería ser promisoría para posteriores estudios tecnológicos. Sin embargo, algunas estrategias deben ser utilizadas con el fin de mejorar la supervivencia durante el almacenamiento a largo plazo, tales como la aplicación de niveles moderados de estrés previo al secado por pulverización, por ejemplo. La aplicación de un estrés térmico, resultó ser una alternativa viable para aumentar la supervivencia de lactobacilos probióticos comerciales durante su almacenamiento en leche descremada (Desmond y col., 2002; Páez y col., 2012), y será explorada en el próximo capítulo.

CAPITULO II: Desarrollo de *L. rhamnosus* 64 en permeado de suero de queso. Efecto de la aplicación de estrés en la supervivencia al secado spray.

1- INTRODUCCIÓN.

La performance y supervivencia de las bacterias probióticas durante el proceso de producción de los cultivos y a lo largo del procesamiento de los alimentos y el paso por el tracto gastrointestinal es cepa dependiente, pero conjuntamente depende de otros factores como la composición del medio de crecimiento, las condiciones de fermentación, el proceso de deshidratación (liofilización o secado spray, principalmente), en el caso de los cultivos que se comercialicen bajo este formato, y la matriz alimentaria utilizada como vehículo (Corcoran y col., 2008; Ranadhera y col., 2010).

La adaptación al estrés es una de las estrategias más utilizadas para mejorar la estabilidad de las bacterias probióticas durante los procesos industriales. Los factores de estrés pueden ser químicos, físicos o biológicos. Algunos son de origen ambiental (como por ejemplo temperatura, presión osmótica, pH, oxígeno disponible, presencia de bilis, antimicrobianos), mientras que otros pueden ser auto-generados (acidez, baja disponibilidad de nutrientes como resultado del metabolismo, generación de especies de oxígeno reactivo) (van de Guchte y col., 2002; Miyoshi y col., 2003; Spano y Massa 2006; Bruno-Bárcena y col., 2010). Las respuestas al estrés son extremadamente importantes para la supervivencia de los microorganismos que experimentan cambios continuos ante factores tales como temperatura, limitación de nutrientes, disponibilidad de agua o presión osmótica. A veces, como en el caso de altas temperaturas y estrés ácido, múltiples mecanismos pueden estar presentes y ser dirigidos en respuesta al desafío de estrés (van de Guchte y col., 2002; Azcárate-Peril y col., 2004). La resistencia cruzada, donde una condición de estrés puede hacer que las células sean resistentes a otras condiciones de estrés, es de hecho, un fenómeno generalizado entre los sistemas de resistencia en BAL, aunque variable entre las especies (van de Guchte y col., 2002). El hecho de que estas condiciones de estrés, relativamente leves, pueden inducir una respuesta adaptativa, sugiere que una pre-exposición de las cepas de interés industrial a una condición de estrés subletal mejoraría su tolerancia hacia un estrés correlacionado pero más severo, ya sea durante el procesamiento o a lo largo del paso por el tracto gastrointestinal (Corcoran y col., 2008, Páez y col., 2012).

La habilidad de tolerar el estrés gástrico es primordial para asegurar la efectividad de los probióticos en alimentos funcionales. El estrés ácido es el principal desafío que deben superar las bacterias luego de ser ingeridas. La tolerancia a otros tipos de estrés como térmico, osmótico u oxidativo es también importante para la incorporación exitosa de bacterias probióticas en alimentos (Ross y col., 2005). En la aplicación práctica la viabilidad de las bacterias probióticas es afectada por factores como la sensibilidad a tratamientos térmicos, la exposición al oxígeno, al peróxido de hidrógeno, a bacteriocinas producidas por cultivos iniciadores o a ambientes ácidos en general (Dave y Shah 1998; Ainsley Reid y col., 2007).

Para la producción de probióticos deshidratados, el secado spray es una de las tecnologías más estudiadas a nivel laboratorio, pero menos utilizadas aún a nivel industrial, ya que su éxito en relación a la viabilidad celular es altamente dependiente de la cepa (Gardiner y col., 2000; Ananta y col., 2005; Páez y col., 2013). El secado spray implica condiciones más severas que la liofilización, siendo el calor y el desafío oxidativo los principales condicionantes de la viabilidad celular. Sin embargo la gran disponibilidad de secaderos spray en nuestra región (de diversas escalas) y dado que es un proceso muy utilizado para la producción de leche en polvo e ingredientes de alimentos, hace del secado por pulverización una tecnología atractiva para la producción de cultivos probióticos. Por lo tanto, además de seleccionar cepas robustas, se deben desarrollar métodos que protejan al microorganismo y aumenten su viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento. Para reducir el daño celular durante el procesamiento y almacenamiento de bacterias probióticas deshidratadas se pueden controlar diferentes variables tecnológicas. Una estrategia propuesta para mejorar la resistencia de los probióticos a la deshidratación es la aplicación de niveles moderados de estrés, previo a la exposición a niveles más severos del mismo o a otros tipos de estrés (Foligne y col., 2013).

OBJETIVO.

El objetivo de este capítulo fue optimizar el desarrollo de *L. rhamnosus* 64 en permeado de suero de queso suplementado y evaluar el efecto de la aplicación de diferentes tipos de estrés frente a un desafío térmico y oxidativo en la supervivencia al secado spray. .

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Microorganismo.

Se utilizó la cepa *L. rhamnosus* 64, perteneciente al Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET). Los cultivos *overnight* (16 h, 37°C) de la misma se obtuvieron en caldo MRS (Biokar, Beauvais, Francia) o en un medio basal complejo denominado WMB (*Weissella* Medium Broth, Tabla 6) (Zotta y col., (2012), después de tres repiques sucesivos a partir de un stock congelado (-70°C), mantenido en MRS - glicerol 18% (p/v) (Cicarelli, Santa Fe, Argentina).

Tabla 6: Composición (g/L) del medio de cultivo WMB.

Triptona	5
KH ₂ PO ₄	1
Extracto de levadura	10
Glucosa	20
Acetato de Sodio	5
Citrato de Sodio	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,05
Tween 80	0,5 mL/L

2.2. Medio de cultivo.

Las actividades descritas hasta el punto 2.5, inclusive, fueron desarrolladas en la Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali, Università degli Studi della Basilicata, Potenza (Italia). El suero de queso (parcialmente diluido debido al proceso de desnatado) se obtuvo de una industria láctea de la región (Potenza, Italia) que produce queso de pasta hilada. El permeado de suero se obtuvo por ultrafiltración tangencial (valor de corte = 20,00 kDa) de suero de queso desnatado (Fig. 11), utilizando una unidad de filtración Sartocon Midi, con membranas de triacetato de celulosa Sartocon (modelo 3021454907E-SG) y se almacenó a -20°C hasta su uso.



Figura 11: Obtención de permeado de suero por ultrafiltración de suero de queso.

El contenido de lactosa y galactosa en el permeado fue de 26,8 g/L y 2,36 g/L, respectivamente, determinado mediante un kit enzimático R-Biopharm (AG, D-64293 Darmstadt, Alemania).

2.3. Desarrollo de *L. rhamnosus* 64 en permeado de suero de queso.

Si bien en el Capítulo 1 se observó una adecuada capacidad de desarrollo de *L. rhamnosus* 64 en permeado de suero, comparado con el caldo MRS, la producción de biomasa puede aún aumentarse si se suplementa adecuadamente el medio de cultivo y si se desarrolla la cepa a pH controlado, para evitar la autoinhibición del crecimiento inducida por la acidez generada en cultivos a pH libre. Con el fin de optimizar la producción de biomasa de la cepa en estudio, evaluando la utilización de distintos ingredientes para la formulación de un medio de desarrollo, se utilizó la metodología estadística de superficie de respuesta que permite la optimización de los diseños experimentales cuando se tienen diversas variables. La principal ventaja es que permite establecer los efectos de las variables y las interacciones entre ellas. Se realizó un experimento factorial fraccional 2^{5-1} para evaluar el efecto de la adición de extracto de levadura (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) (0 - 2,5 g/L), triptona (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) (0 - 5 g/L), NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, Milán, Italia) (0 - 1,25 g/L), solución de Tween 80 (Sigma-Aldrich, Milán, Italia) (0 - 0,5 mL/L) y solución Mn-Mg (MgSO₄ 20 g/L y 4 g/L de MnSO₄ Sigma-Aldrich, Milán, Italia) (0 - 10 mL/L) en el desarrollo de *L. rhamnosus* 64 (Tabla 7, corridas 1 a 16). Se realizó un cultivo de la cepa en anaerobiosis en el medio de cultivo WMB-Lactosa, el pellet se lavó 2 veces (6000 rpm, 10 min) con PBS (pH 7,4) y se ajustó la densidad óptica (DO_{650nm}) a 1. Esta suspensión celular se utilizó como inóculo 1% (v/v). La incubación se realizó durante 16 h a 37°C en anaerobiosis (Generbox, BioMerieux SA, Marcy l'Etoile, Francia, con AnaeroGenbags, Oxoid).

Se determinó la DO_{650nm} (BioRad SmartSpec™ Plus) y pH (electrodo doble Poro Delgado, Hamilton Company, Reno, Nevada, EEUU), y para aquellas condiciones en las que se observó la mayor DO_{650nm}, se realizó el recuento en el medio WMA (WMB adicionado con 1,2% (p/v) de agar (37°C, 48 h, anaerobiosis) y se determinó la biomasa producida por diferencia de peso seco (105°C, 24 h). Para estimar el número de células y biomasa en todas las demás condiciones, se utilizó una curva estándar relacionando DO_{650nm} y recuentos de células o peso seco de la biomasa (regresión lineal). Se llevaron a cabo ocho

ensayos adicionales (Tabla 8, corridas 17 a 24) variando las concentraciones de extracto de levadura, triptona, Tween 80 y la solución Mn-Mg para validar el modelo. El costo de los diferentes medios se estimó directamente a partir del costo de los ingredientes.

2.4. Cinética de crecimiento durante la fermentación a pH controlado.

Para realizar la cinética de crecimiento de *L. rhamnosus* 64, se utilizó como medio de cultivo la formulación del experimento factorial fraccional donde se obtuvieron los resultados más satisfactorios (mayor cantidad de biomasa y mayor recuento de células viables), denominado Run 20 y compuesto por permeado de suero suplementado con 2,5 g/L de extracto de levadura, 2,5 g/L de triptona, 5 mL/L de solución de Mg-Mn (MgSO_4 20 g/L y 4 g/L de MnSO_4). Se realizaron fermentaciones (37°C) en paralelo en anaerobiosis (AN, nitrógeno 0,1 vol vol⁻¹ min⁻¹) o aerobiosis (AE, aire 0,1 vol vol⁻¹ min⁻¹) a pH controlado constante de 6 y 6,5 con el agregado de NH_4OH (4 N) o la combinación de Na_2CO_3 (212 g/L) / NaOH (160 g/L) para el control del pH. Los fermentadores (1 L, Applikon, Schiedam, the Netherlands) (Fig. 12) fueron inoculados 1% (v/v) con un cultivo *overnight* en WMB. Se controló la agitación por medio de un agitador magnético (250 rpm, Heidolph MR Hei-Mix D). Se estimó el desarrollo de *L. rhamnosus* 64 por medición de $\text{DO}_{650\text{ nm}}$ como se describió anteriormente. Cuando fue necesario, la suspensión de células se diluyó con medio estéril, hasta alcanzar un rango de $\text{DO}_{650\text{ nm}}$ 0,05 – 0,7 y el factor de dilución (D) se usó para calcular el $D \cdot \text{DO}_{650\text{ nm}}$ (DOD).

Se monitoreó la cantidad de base adicionada al fermentador a intervalos de 30 minutos. Los datos se transformaron a \ln (meq base/L) y se graficaron en función de los valores de \ln de DOD.

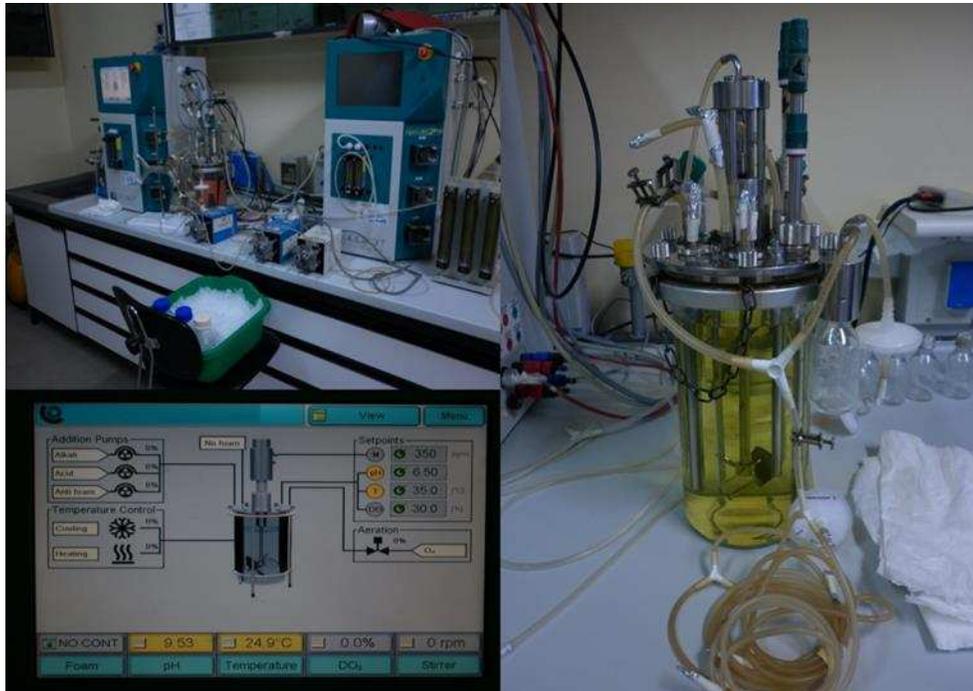


Figura 12: Fermentadores 1 L, Applikon, Università degli Studi della Basilicata (Potenza, Italia).

Las curvas de crecimiento de todas las fermentaciones (como los datos $\ln X/X_0$, donde X es la estimación de peso seco mientras que X_0 es el peso seco de células en tiempo 0, estimados en \ln meq base/L) fueron modeladas usando el modelo dinámico de Baranyi y Roberts (1994) con el software DMFit v. 2.0 (Baranyi & Le Marc, 1996).

2.4.1 ANÁLISIS QUÍMICOS.

Se cuantificaron lactosa, galactosa, ácido láctico (D y L) y ácido acético en el medio de cultivo y en el sobrenadante usando kits enzimáticos (R-Biopharm AG, D-64293 Darmstadt, Alemania).

2.5. Efecto de la exposición a diferentes tipos de estrés en la respuesta al desafío térmico y oxidativo.

Los cultivos de la cepa en estudio, en fase exponencial o estacionaria, fueron sometidos (o no, control) directamente en el fermentador a tres factores de estrés: aeróbico (AER, 1 h aire 0,3 vol/min, pH 6, 37°C); térmico (CALOR, 1 h, pH 6, 45°C, anaerobiosis) y ácido (ÁCIDO, 1 h, pH 5, 37°C, anaerobiosis). Las células fueron recuperadas del fermentador y concentradas por centrifugación (12.000 x *g*, 5 min), lavadas dos veces con buffer PBS (pH 7,4) y resuspendidas en el mismo buffer (DO₆₅₀ = 1). En estas suspensiones celulares, las cuales recibieron los tratamientos de estrés moderado aplicados en el fermentador, se evaluó la tolerancia a los desafíos térmico y oxidativo (por sus siglas en inglés: heat challenge: HC y oxidative challenge: OC), mediante exposición a 55°C, 15 min (HC) o adicionando H₂O₂ 37°C 15 min (OC) hasta una concentración final de 0,4 mmol/L.

El recuento de células viables se llevó a cabo por siembra en profundidad en WMA pH 6,8 + 0,05% (p/v) de cisteína (para el recuento de células viables y dañadas subletalmente) y en WMA pH 5,5 (para el recuento de células viables). Las placas se incubaron a 37°C por 48 h en anaerobiosis. Se evaluó además la tolerancia de las células control y de las células en fase estacionaria sometidas a estrés ácido (pH 5) luego de la exposición al calor (HC) o a H₂O₂ (OC) por 0, 2, 5, 10 y 15 min.

2.6. Selección de la matriz para secado spray.

Se obtuvo biomasa de *L. rhamnosus* 64 en un fermentador de 2 L (Sartorius Biostat A plus) inoculado 1% (v/v) con un cultivo *overnight* (16 h, 37°C) obtenido en el medio permeado de suero formulado. Como medio de cultivo se utilizó permeado de suero de quesería reconstituido 9% (p/v) (Arla Foods, Porteña, Córdoba, Argentina) suplementado con 2,5 g/L de extracto de levadura, 2,5 g/L de triptona y 5 mL/L de solución Mg-Mn

(MgSO₄ 2%p/v y 0,4% p/v de MnSO₄). La fermentación se realizó bajo condiciones de anaerobiosis con flujo de CO₂ (0,2 L/min, agitación 200 rpm), manteniéndose a pH 6 constante por adición automática de una solución estéril de Na₂CO₃ (211,96 g/L) / NaOH (160 g/L). Las células se cosecharon (6000 rpm, 15 min, 4°C), se lavaron dos veces con buffer PBS (pH 7,4) y se resuspendieron en suero de quesería 10% (p/v) (Arla Foods) suplementado con almidón de maíz 10% (p/v) (Glutal S.A., Buenos Aires, Argentina), goma arábica 10% (p/v) (Gelfix, Buenos Aires, Argentina), WPC 80 10% (p/v) (Arla Foods), o maltodextrina 10% (p/v) (Gelfix, Buenos Aires, Argentina). Las suspensiones celulares (20% p/v de sólidos totales, relación 1:1) se deshidrataron en un secadero spray de laboratorio (Büchi mini spray dryer modelo B-290, Flawil, Suiza) bajo las siguientes condiciones: caudal de alimentación de 5 mL/min, temperatura de entrada constante de 140°C, temperatura de salida de 83°C y flujo de aire de 357 L/h. La viabilidad celular se determinó por recuentos en agar MRS (Biokar, Beauvais, Francia) (48 h, 37°C, aerobiosis) antes y después del secado spray, y luego de 30, 60 y 120 días de almacenamiento de los polvos obtenidos envasados al vacío y conservados a 5°C en oscuridad. 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 restaurar la solución a las condiciones anteriores al secado spray y poder comparar los recuentos en UFC/mL.

2.7. Efecto de la aplicación de distintos tipos de estrés sobre la supervivencia al secado spray.

2.7.1. APLICACIÓN DE ESTRÉS TÉRMICO, ÁCIDO Y TERMOÁCIDO Y SECADO SPRAY EN SUERO DE QUESO-ALMIDÓN.

Se obtuvo biomasa de *L. rhamnosus* 64 en un fermentador de 2 L (Sartorius Biostat A plus) inoculado 1% (v/v) con un cultivo *overnight* (16 h, 37°C) obtenido en el medio permeado de suero formulado. Como medio de cultivo se utilizó permeado de suero de quesería reconstituido 9% (p/v) (Arla Foods, Porteña, Córdoba, Argentina) suplementado

con 2,5 g/L de extracto de levadura, 2,5 g/L de triptona y 5 mL/L de solución Mg-Mn (MgSO_4 2% p/v y 0,4% p/v de MnSO_4). La fermentación se realizó bajo condiciones de anaerobiosis con flujo de CO_2 (0,2 L/min, agitación 200 rpm), manteniéndose a pH 6 constante por adición automática de una solución estéril de Na_2CO_3 (211,96 g/L) / NaOH (160 g/L). Muestras de 400 mL se transfirieron a botellas de cultivo y se aplicaron las siguientes condiciones de estrés moderado: control (sin tratamiento), calor (52°C, 15 min), ácido (60 min, pH 4 alcanzado por adición de ácido láctico 85%, Tuteur S.A.C.I.F.I.A., Buenos Aires, Argentina) o combinación de calor y acidez (52°C, 15 min, pH 4). Las células tratadas y control se cosecharon (6000 rpm, 15 min, 4°C), se lavaron dos veces con buffer PBS (pH 7,4), se resuspendieron en solución de suero de queso-almidón (10%-10% p/v) y se secaron spray como se describió previamente. Se determinó la viabilidad celular por recuentos en agar MRS (Biokar) (48 h, 37°C, aerobiosis) previo y posterior al secado spray (Fig. 13).

2.7.2. APLICACIÓN DE ESTRÉS TÉRMICO MODERADO EN EL FERMENTADOR Y SECADO SPRAY EN SUERO DE QUESO-ALMIDÓN.

La biomasa de *L. rhamnosus* 64 se obtuvo como se describió en el ítem 2.7. Luego de la fermentación, se retiró del fermentador 1 L del cultivo (cultivo control) y al cultivo restante se le aplicó un estrés térmico moderado (1 h, 45°C, 200 rpm) directamente en el fermentador. Las células tratadas y control se cosecharon (6000 rpm, 15 min, 4°C), se lavaron dos veces con buffer PBS (pH 7,4), los pellets se resuspendieron en solución de suero de queso-almidón (10%-10% p/v) y se secaron spray como se describió en el ítem anterior. La viabilidad celular se determinó por recuentos en agar MRS (Biokar) (48 h, 37°C, aerobiosis) previo y posterior al secado spray y durante el almacenamiento de los polvos.

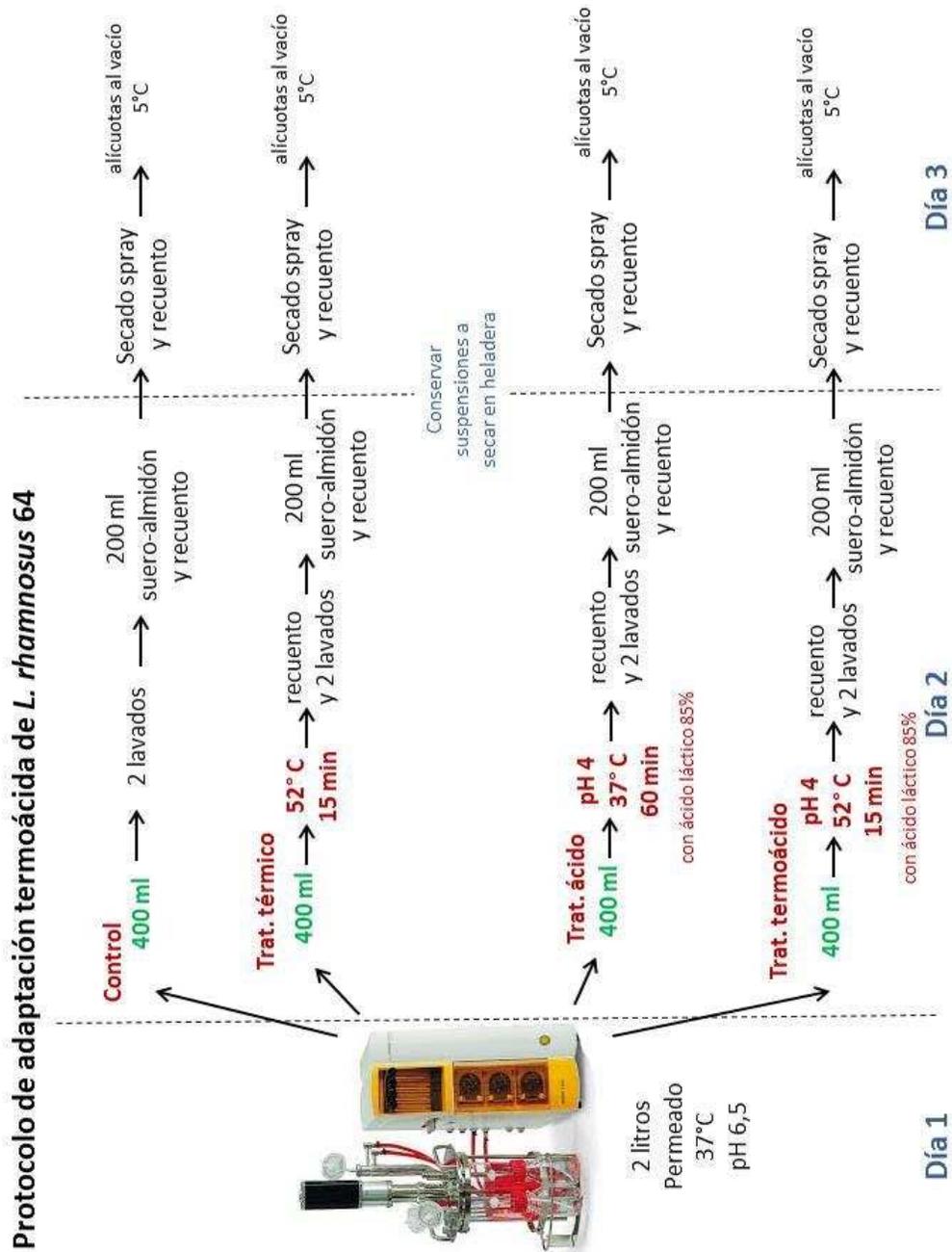


Figura 13: Aplicación de diferentes tipos de estrés a biomasa de *L. rhamnosus* 64.

2.8. Análisis estadístico.

El análisis estadístico y los gráficos se realizaron utilizando el software Systat 13 (Systat Inc., Chicago, IL, Estados Unidos). Los resultados del experimento factorial fraccional se analizaron utilizando el Procedimiento del Modelo Lineal General de Systat 13.0 (Systat) y se calcularon tanto los efectos de los factores principales como de las interacciones. Se utilizó ANOVA y comparaciones de medias múltiples (test HSD de Tukey) para analizar los resultados de los tratamientos realizados a tiempos fijos. Las cinéticas de inactivación se ajustaron utilizando un modelo de Weibull (Van Boekel, 2002).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Producción de biomasa de *L. rhamnosus* 64 en permeado de suero.

Los tecnólogos en alimentos que desarrollan sus actividades en el campo de la producción de microorganismos probióticos tienen el desafío de producir cultivos utilizando medios de cultivo y tecnologías de conservación de bajo costo para mantener la competitividad, y cubrir los nuevos mercados de alimentos en donde estos microorganismos son utilizados (Muller y col., 2009). Como se mostró en el capítulo anterior, el suero de queso, el permeado de suero y el suero de ricota son medios de cultivo de interés para la producción de biomasa de *L. rhamnosus* 64, logrando un aumento de 2 órdenes log (inóculo 1% v/v) luego de 24 h de cultivo a pH libre (los recuentos variaron de 8,7 a 9,0 log UFC/mL). Sin embargo, la demanda biológica de oxígeno en los medios utilizados fue alta, aún después de la fermentación, indicando la presencia de nutrientes sin consumir y de metabolitos excretados (lactato por ejemplo) ricos en carbono, que podrían ser aún utilizados como fuente de energía. Además, actualmente existen múltiples posibilidades para una mayor valorización del suero de queso (Prazeres y col., 2012), mientras que el permeado de suero ha sido menos explotado para su valorización en relación a la producción de biomasa de BAL

(Christopherson y Zottola, 1989; Parente y Zottola, 1991) o productos derivados de su metabolismo tales como nisina (Desjardins y col., 2001), exopolisacáridos (Macedo y col., 2002), o ácido láctico (Schepers y col., 2006; Fitzpatrick y O'Keeffe, 2001). La utilización del permeado de suero de queso como medio de crecimiento toma importancia debido al gran valor que hoy tiene la proteína de suero ya sea como concentrado de proteínas de suero (WPC del inglés whey protein concentrate) o aislados de proteínas de suero (WPI del inglés whey protein isolate), siendo el permeado un efluente del proceso de obtención de estas fracciones proteicas. Debido a esto el permeado se podría revalorizar como un medio de cultivo de bajo costo, compuesto mayoritariamente por lactosa. El hecho de que la proporción de la fuente de carbono sea mucho mayor respecto a la de nitrógeno, justifica una suplementación para mejorar el desarrollo de BAL en este medio (Macedo y col., 2002). En este contexto, se decidió evaluar el uso de permeado de suero de queso para la producción de biomasa de *L. rhamosus* 64.

En general, los lactobacilos son capaces de hidrolizar la lactosa a glucosa y galactosa para utilizarlos como fuente de energía. Esto permite el desarrollo de estos microorganismos en leche y productos relacionados tales como suero de queso y permeado de suero. Para formular un medio de desarrollo basado en permeado de suero se tuvieron en cuenta resultados anteriores donde se observó que el permeado de suero de queso por sí solo no siempre es un medio de cultivo adecuado para el desarrollo de BAL (Macedo y col., 2002). Según Schepers y col., (2006) tanto la fuente nitrogenada como las vitaminas son un factor limitante para la producción de ácido láctico por BAL a partir de permeado de suero, esta suplementación es un 38% del costo final del producto, por lo que es imprescindible la optimización de la concentración de los ingredientes a utilizar.

Un medio de cultivo apropiado para lactobacilos debe tener péptidos como fuente de nitrógeno, azúcares (ej: lactosa o glucosa) como fuente de carbono, extracto de levadura como factor de crecimiento, al igual que magnesio y manganeso en concentraciones adecuadas, ya que su exceso podría inhibir algunas cepas. Por su parte, el agregado de Tween 80 proporciona los ácidos grasos requeridos a nivel de las membranas biológicas (Djehri-Hocine y col., 2010). Dong y col., (2014) determinaron que el uso de

peptona o la combinación de extracto de levadura y peptona aumenta la producción de biomasa más que el uso solamente de extracto de levadura.

El crecimiento de *L. rhamnosus* 64 en permeado de suero diluido (proveniente de una industria láctea de la región de Potenza, Italia) sin suplementar a pH libre fue insuficiente (1,3 órdenes log), alcanzando 1×10^8 UFC/mL en fase estacionaria, en comparación con 2 órdenes log de desarrollo observados anteriormente (capítulo 1, Figura 4) en permeado de suero no diluido (7,47 % de lactosa).

Como resultado del diseño experimental factorial fraccional 2^{5-1} para optimizar el desarrollo en permeado de suero diluido (2,5 % de lactosa), usando extracto de levadura, triptona, Tween 80 y solución de Mg-Mn como suplementos, en la Tabla 7 (corridas 1-16) se puede observar la influencia del agregado de cada ingrediente sobre la producción de biomasa y el recuento de células. Todos los ingredientes estudiados tuvieron un efecto significativo en el desarrollo, ya sea como factores principales o como la interacción de dos factores y el modelo tuvo un ajuste $R^2 = 0,99$. El cálculo de los coeficientes y su importancia se muestran en la Tabla 8. El extracto de levadura y la triptona fueron los ingredientes con mayor efecto positivo, coincidiendo con lo publicado por Dong y col. (2014), mientras que la adición de carbonato de sodio tuvo un efecto negativo. La interpretación del efecto de Tween 80 y de la solución Mg-Mn fue más compleja debido a la interacción de los factores. Se llevaron a cabo ocho ensayos adicionales (corridas 17-24, Tabla 9) para validar el modelo y formular un medio que pudiera maximizar el crecimiento minimizando el costo. La desviación absoluta de los resultados experimentales en el modelo de validación respecto de los valores predichos fue de 2,86% (min. 0,04, max. 4,866%) confirmando, de esta manera, la buena capacidad predictiva del modelo. Los mejores resultados se obtuvieron para la corrida (Run) 20, donde se obtuvieron 8,96 log UFC/mL de la cepa en estudio y 1,3 g/L de biomasa a un costo estimado de 1,08 €/10¹² UFC. Esta formulación del medio de cultivo fue utilizada en todos los experimentos siguientes. El experimento factorial fraccional 2^{5-1} permitió un aumento de 1 orden log en el recuento de células respecto por ejemplo a las corridas sin el agregado de extracto de levadura y triptona (ej: corrida 4 permeado con NaCO₃, Tween 80 y solución de Mg-Mn 7,8

log UFC/mL y 0,146 g/L de biomasa). El extracto de levadura y la triptona fueron los factores con mayor efecto positivo en el crecimiento, ya que las fuentes nitrogenadas utilizadas son ingredientes promotores de crecimiento de BAL (Macedo y col., 2002; Burns y col., 2008).

Tabla 7: Experimento factorial fraccional para la evaluación del desarrollo de *L. rhamnosus* 64 en permeado de suero de queso diluido suplementado con: extracto de levadura (YE, g/L), triptona (TRY, g/L), carbonato de sodio (Na₂ CO₃, g/L), Tween 80 (TW, mL/L), y solución Mg-Mn, (mL/L). La media y el error estándar se muestran para DOD (calculado como el producto de DO por la dilución necesaria para llevar DO_{650nm} por debajo de 0,7), biomasa estimada (X, g/L) recuentos estimados, log (UFC/mL) y costo estimado (1 € / 10¹² UFC).

Run	YE	TRY	CO3	TW	MgMn	pH	DOD	X	log (UFC/mL)	Costo
1	0	0	0	0	10	5,85±0,01	0,37±0,01	0,16±0,01	8,04±0,01	1,49±0,04
2	0	0	0	0,5	0	5,99±0,01	0,35±0,01	0,15±0,01	8,01±0,01	3,88±0,11
3	0	0	1,25	0	0	6,31±0,01	0,11±0	0,04±0	7,51±0,01	4,16±0,18
4	0	0	1,25	0,5	10	6,15±0,01	0,22±0,01	0,09±0	7,80±0,01	10,88±0,49
5	0	5	0	0	0	5,43±0,12	0,90±0,02	0,38±0,01	8,42±0,01	2,74±0,07
6	0	5	0	0,5	10	4,89±0,06	1,37±0,02	0,59±0,01	8,60±0	3,18±0,05
7	0	5	1,25	0	10	5,81±0,09	0,72±0,07	0,31±0,03	8,32±0,04	4,91±0,47
8	0	5	1,25	0,5	0	5,74±0,08	0,82±0,09	0,35±0,04	8,37±0,05	5,29±0,61
9	2,5	0	0	0	0	5,36±0,06	1,33±0,01	0,57±0	8,59±0	0,92±0,01
10	2,5	0	0	0,5	10	4,89±0,03	1,55±0,07	0,67±0,03	8,65±0,02	2,01±0,09
11	2,5	0	1,25	0	10	5,55±0,02	1,08±0,09	0,46±0,03	8,49±0,03	2,10±0,17
12	2,5	0	1,25	0,5	0	6,23±0,06	0,31±0,02	0,13±0,01	7,96±0,03	9,81±0,78
13	2,5	5	0	0	10	4,83±0,01	2,19±0,06	0,9±0,02	8,80±0,01	1,94±0,05
14	2,5	5	0	0,5	0	5,02±0,04	1,83±0,06	0,78±0,02	8,72±0,01	2,70±0,09
15	2,5	5	1,25	0	0	4,82±0,01	2,06±0,04	0,89±0,01	8,78±0,01	2,02±0,04
16	2,5	5	1,25	0,5	10	4,40±0,04	2,88±0,09	1,24±0,04	8,92±0,01	2,11±0,06

Tabla 8: Estimaciones y errores estándares (SE) del modelo lineal utilizado para determinar el efecto de extracto de levadura, triptona, Na₂CO₃, Tween 80 y solución Mg-Mn, en el desarrollo de *L. rhamnosus* 64 en permeado de suero de queso.

Efecto	Coficiente ± SE	p-valor*
CONSTANT	8,377±0,006	0,000
X ₁ (Extracto de levadura)	0,241±0,006	0,000
X ₂ (triptona)	0,244±0,006	0,000
X ₃ (Na ₂ CO ₃)	-0,104±0,006	0,000
X ₄ (Tween 80)	0,006±0,006	0,331
X ₅ (Solución Mg-Mn)	0,079±0,006	0,000
X ₁ * X ₂	-0,052±0,006	0,000
X ₁ * X ₃	0,026±0,006	0,000
X ₁ * X ₄	-0,057±0,006	0,000
X ₁ * X ₅	0,025±0,006	0,001
X ₂ * X ₃	0,084±0,006	0,000
X ₂ * X ₄	0,032±0,006	0,000
X ₂ * X ₅	-0,035±0,006	0,000
X ₃ * X ₄	-0,012±0,006	0,063
X ₃ * X ₅	0,035±0,006	0,000
X ₄ * X ₅	0,036±0,006	0,000

Es estadísticamente significativo cuando *p-valor < 0,05

Tabla 9: Ensayos confirmatorios del diseño factorial fraccional (corridas 17-24 en permeado de suero de queso diluido suplementado con: extracto de levadura (YE, g/L), triptona (TRY, g/L), carbonato de sodio (CO3, g/L), Tween 80 (TW, mL/L), y solución Mg-Mn, (mL/L). La media y el error estándar se muestran para DOD (calculado como el producto de DO por la dilución necesaria para llevar DO_{650nm} por debajo de 0,7), biomasa estimada (X, g/L) recuentos estimados, log (UFC/mL) y costo estimado (€ / 10¹² UFC).

Run	YE	TRY	CO3	TW	MgMn	pH	DOD	X	log (UFC/mL)	Costo
17	2,5	5	1,25	0,5	10	4,27±0,03	3,27±0,09	1,41±0,04	8,98±0,01	1,85±0,05
18	2,5	2,5	0	0	0	4,82±0,03	2,40±0,08	1,03±0,03	8,84±0,01	1,02±0,03
19	2,5	2,5	0	0,5	10	4,24±0,01	3,09±0,02	1,33±0,01	8,95±0,01	1,41±0,01
20	2,5	2,5	0	0,25	5	4,19±0,01	3,16±0,03	1,36±0,01	8,96±0,01	1,08±0,01
21	2,5	2,5	1,25	0	0	4,83±0,04	2,34±0,06	1,00±0,02	8,83±0,01	1,25±0,03
22	1,25	5	0	0,25	5	4,20±0,01	3,20±0,05	1,38±0,02	8,97±0,01	1,26±0,02
23	1,25	2,5	0	0,5	10	4,36±0,01	3,06±0,08	1,32±0,03	8,95±0,01	1,22±0,03
24	0	5	0	0,5	10	4,36±0,05	2,9±0,14	1,25±0,06	8,92±0,02	1,51±0,07

3.2. Cinética de crecimiento durante la fermentación a pH controlado.

Para evaluar la cinética de crecimiento se realizaron fermentaciones en el medio formulado seleccionado (Run 20), en anaerobiosis (N_2) y a pH 6 usando como solución neutralizante $Na_2CO_3/NaOH$. Estas condiciones se determinaron luego de ensayos preliminares, en los cuales se compararon los efectos de pH (6,0 o 6,5), agente neutralizante ($Na_2CO_3/NaOH$ o NH_4OH) o la utilización de 5 g/L de triptona. En las Figuras 14, 15, 16 y 17 se muestran ejemplos de cinéticas de crecimiento ($\ln X/X_0$), donde se observa el efecto de las distintas variables implicadas en la fermentación. Se realizaron fermentaciones en condiciones anaeróbicas (flujo de N_2 ; 8 réplicas) y aeróbicas (flujo de aire, 2 réplicas ya que en esta condición el desarrollo de *L. rhamnosus* 64 no fue satisfactorio) y se monitoreó el agregado de base en todas las fermentaciones, mientras que la cinética de crecimiento fue monitoreada (medición de $DO_{560\text{ nm}}$ a intervalos de 1h, recuentos y determinación de biomasa al final de la fermentación) en dos fermentaciones bajo cada condición.

El monitoreo del agregado de base (ln meq base/L) proporcionó estimaciones satisfactorias ($R^2 = 0,92$) de biomasa y viabilidad (log UFC/mL) por lo tanto, los valores de células viables estimados fueron utilizados para modelar la cinética de crecimiento siguiendo el modelo D de Baranyi y Roberts (1994). Este modelo proporcionó una reconstrucción satisfactoria de los datos experimentales ($R^2 > 0,99$). En la Tabla 10 se muestran parámetros de crecimiento y rendimientos de las fermentaciones en anaerobiosis y aerobiosis.

Las condiciones aeróbicas dieron como resultado una significativa reducción ($p < 0,001$) de la velocidad de crecimiento (μ_{max}), del rendimiento de biomasa y un menor recuento final. El tiempo medio de generación en la fase de crecimiento exponencial fue de 1,95 h y 2,37 h en condiciones anaeróbicas y aeróbicas, respectivamente. Las fermentaciones en condiciones de anaerobiosis fueron más rápidas y eficientes por lo tanto las demás cinéticas se realizaron en anaerobiosis.

No se observaron diferencias entre pH 6 y pH 6,5, por lo que se seleccionó pH 6 ya que se observó una fase de latencia (lag) menor comparada con pH 6,5. Para mantener el

pH en 6 se utilizó Na_2CO_3 (211,96 g/L) / NaOH (160 g/L) ya que favoreció la producción de biomasa (3,04 g/L) y el recuento de células viables $1,09 \times 10^{10}$ UFC/mL en comparación con NH_4OH (4 N), donde se observó una biomasa de 2,55 g/L y un recuento de células viables de 8×10^9 UFC/mL respectivamente.

En la comparación entre Run 20 vs Run 20M (con 5 g/L de triptona) el objetivo fue evaluar el efecto de incrementar la fuente nitrogenada del medio de cultivo, en este caso triptona. En la Figura 17 se observa que no hubo diferencias en la cinética de crecimiento de *L. rhamnosus* 64, no se observó ninguna ventaja sobre el desarrollo de la cepa al incrementar el contenido de triptona en la composición del medio de cultivo.

Al final de las fermentaciones en anaerobiosis (pH 6) el contenido promedio de lactosa fue menor a 0,3 g/L y el contenido de L - ácido láctico fue del 94% del ácido láctico total, mientras que en la mitad de la fase exponencial fue sólo del 70% (datos no mostrados). El ácido acético siempre estuvo por debajo del límite de detección (0,02 g/L). Las fermentaciones fueron altamente reproducibles (excepto la fase lag, la cual dependía del estado fisiológico del inóculo).

Tabla 10: Parámetros cinéticos para las fermentaciones realizadas en anaerobiosis (AN, promedio y error estándar de 6 fermentaciones) y en aerobiosis (AE, promedio y error estándar de 2 fermentaciones). Tasa máxima de crecimiento específico (μ_{max}), duración de la etapa de latencia (lag), porcentaje del sustrato consumido (%), rendimiento ($Y_{X/S}$ rendimiento de la biomasa, sustrato g/g, $Y_{P/S}$ rendimiento del ácido láctico, sustrato g/g), biomasa final (X_{max}) y recuento de células viables (log UFC/mL). Con la excepción del % de sustrato consumido y $Y_{P/S}$, las diferencias entre AN y AE fueron siempre significativas ($p < 0,001$).

	μ_{max} (h^{-1})	lag (h^{-1})	%	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	X_{max}	log(UFC/mL)
AN	0,355±0,004	2,56±0,61	99,16±0,04	0,11±0,01	0,93±0,01	3,05±0,04	10,06±0,01
AE	0,292±0,004	2,29±0,07	99,14±0,03	0,08±0,01	0,93±0,01	2,82±0,01	9,66±0,16

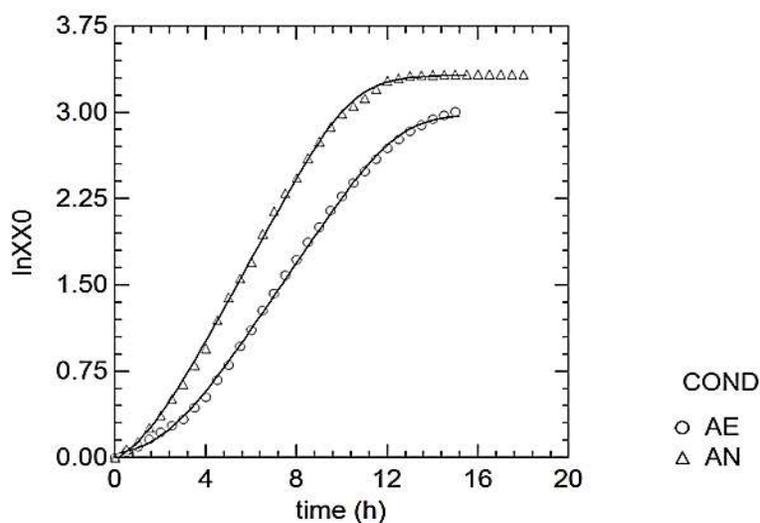


Figura 14: Cinéticas de crecimiento de *L. rhamnosus* 64 en medio de cultivo Run 20: permeado de suero diluido adicionado de 2,5 g/L de extracto de levadura, 2,5 g/L de triptona, 0,25 mL/L de Tween 80 y 5 mL/L de solución Mg/Mn, en aerobiosis (AE) y anaerobiosis (AN) a pH 6 controlado con la adición de NaOH/Na₂CO₃.

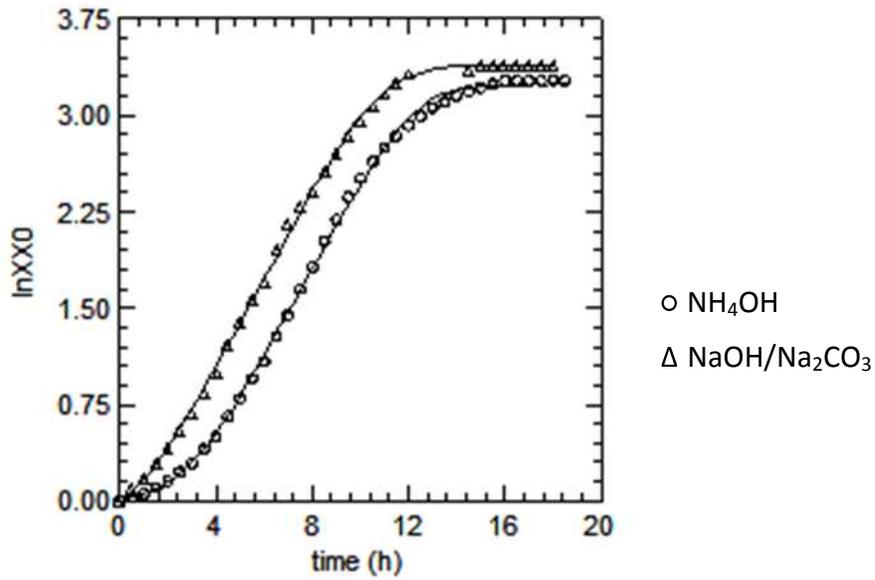


Figura 15: Cinéticas de crecimiento de *L. rhamnosus* 64 en permeado de suero formulado (Run 20), en anaerobiosis a pH 6, utilizando diferentes agentes de control de pH.

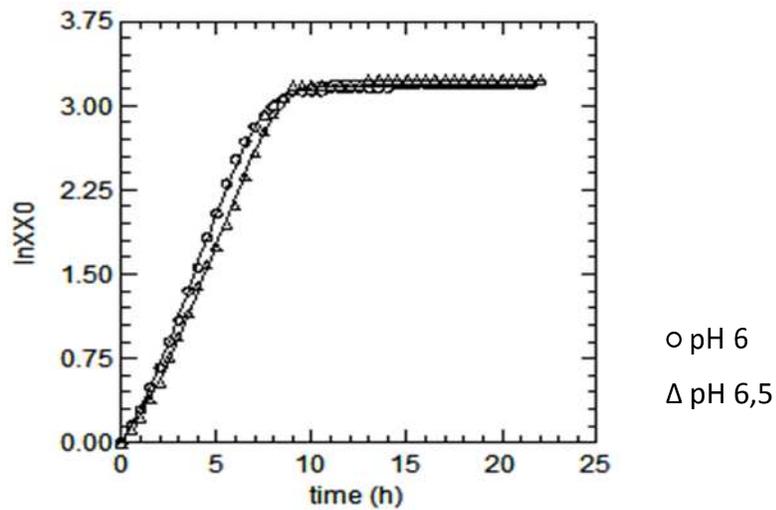


Figura 16: Cinéticas de crecimiento de *L. rhamnosus* 64 en permeado de suero formulado (RUN 20), en anaerobiosis a diferente pH, con la adición de NaOH/Na₂CO₃

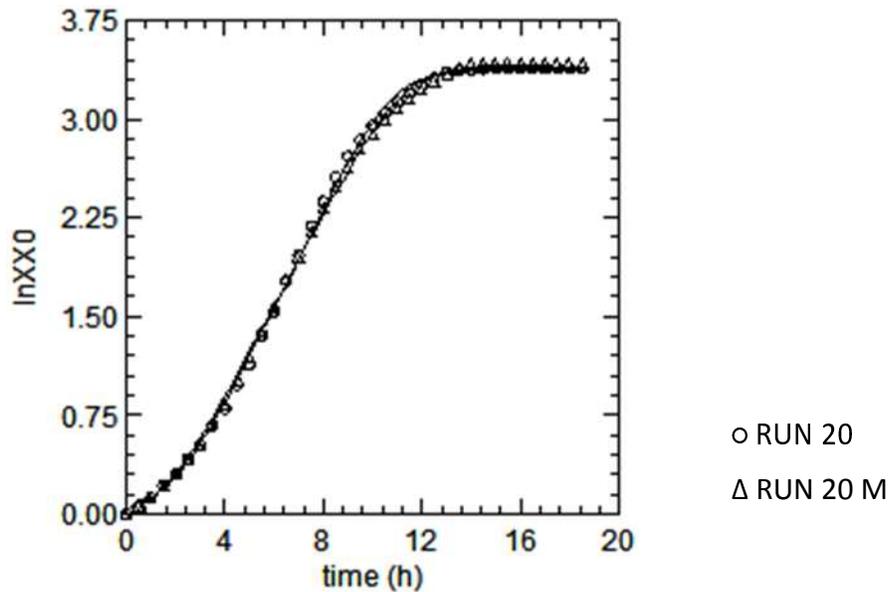


Figura 17: Cinéticas de crecimiento de *L. rhamnosus* 64 en distintos medios de cultivo. Run 20: permeado de suero con 2,5 g/L de extracto de levadura, 2,5 g/L de triptona, 0,25 mL/L de Tween 80 y 5 mL/L de solución Mg/Mn y RUN 20 M permeado de suero con 2,5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de triptona, 0,25 mL/L de Tween 80 y 5 mL/L de solución Mg/Mn.

3.3. Efecto de la aplicación de estrés moderado en la supervivencia al desafío térmico y oxidativo.

Con el fin de evaluar el efecto del crecimiento aeróbico (AE) o anaeróbico (AN) sobre la respuesta al estrés, las células en fase estacionaria temprana fueron sometidas a los desafíos térmico (HC, del inglés heat challenge) u oxidativo (OC, del inglés oxidative challenge) (Fig. 18). Los desafíos oxidativo, térmico y osmótico son los factores principales de estrés a los que se enfrentan los microorganismos durante el secado spray (Peighambardoust y col., 2011). El estudio de la respuesta al desafío térmico y oxidativo fue una manera simplificada de analizar, separadamente, la respuesta de la cepa en estudio a los factores de estrés encontrados durante el secado spray. *L. rhamnosus* 64 fue

más sensible al OC que al HC, bajo las condiciones evaluadas, independientemente del hecho que la producción de biomasa fuese aeróbica o anaeróbica. La fermentación anaeróbica produjo células más tolerantes a ambos desafíos. Estos resultados son contrarios a los que se informaron para *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (Zotta y col., 2012). Sin embargo para *L. plantarum* (Parente y col., 2010; Zotta y col., 2013) y para *Lactobacillus casei* (Zotta y col., 2014) la respuesta a distintos tipos de estrés fue dependiente de la cepa. Guilbaud y col., (2012) evaluaron varias cepas de *Lactobacillus sakei* e informaron que la resistencia al estrés oxidativo era extremadamente variable, incluso dentro de una misma especie. La capacidad de los lactobacilos para usar el oxígeno como receptor final en una cadena de transporte de electrones, o de utilizarlo a través de la ruta del piruvato oxidasa/acetato quinasa, es variable (Liu, 2003; Pedersen, y col., 2012; Zotta, y col., 2013; Zotta y col., 2014) y aun cuando el crecimiento en aerobiosis a veces puede mejorar el rendimiento y la tolerancia al estrés oxidativo, el efecto es cepa dependiente.

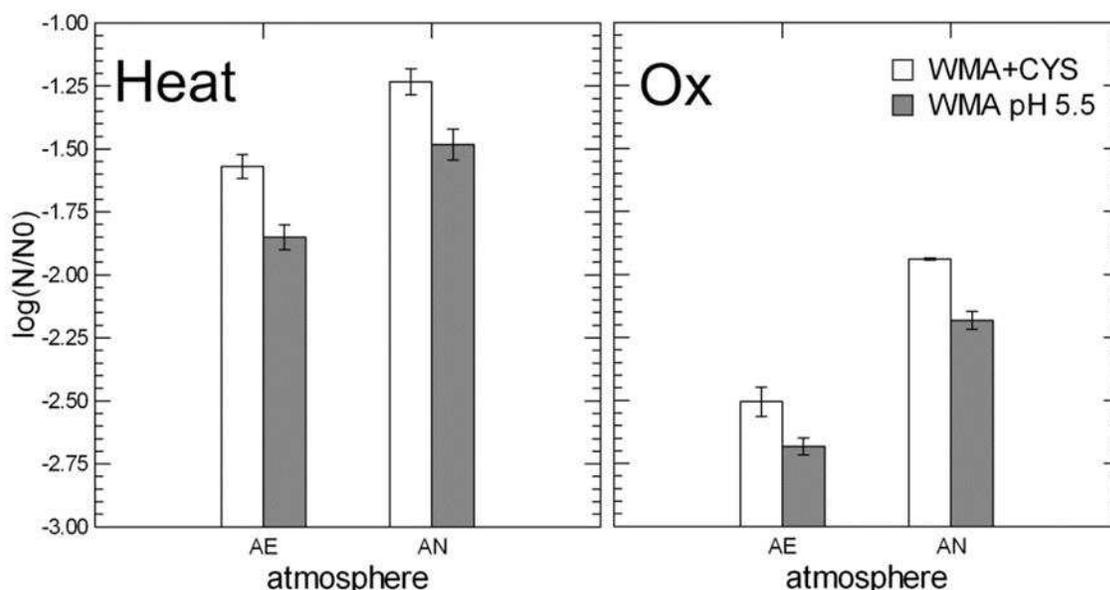


Figura 18: Efecto del desafío térmico (Heat 55°C, 15 min) y oxidativo (Ox 0,04 mmol/L H₂O₂, 15 min, 37°C) en la supervivencia de *L. rhamnosus* 64 cosechado en fase estacionaria temprana y desarrollado en permeado de suero de queso diluido y formulado (Run 20), bajo condiciones aeróbicas (AE) o anaeróbicas (AN). Luego del desafío, las células sobrevivientes fueron enumeradas en WMA + cisteína (células viables + células dañadas subletalmente, barras blancas) y en WMA pH 5.5 (células viables, barras grises). A mayor altura de la barra, mayor resistencia de la cepa al desafío en particular.

La supervivencia a los dos desafíos fue significativamente mayor ($p = 0,02$) en el caso de células cultivadas en anaerobiosis respecto al cultivo en aerobiosis. El recuento de células viables se realizó en WMA a pH 5,5 y el recuento total de células viables + células dañadas subletalmente (injuradas) se realizó en WMA + cisteína. La supervivencia al HC fue significativamente mayor con respecto a la sobrevivencia al OC tanto en aerobiosis como en anaerobiosis ($p < 0,001$). La fracción de células dañadas (0,39 – 0,41) no fue significativamente diferente entre los desafíos y las condiciones de cultivo (Fig. 18).

Se evaluaron los efectos de la aplicación de tratamientos moderados de estrés ácido (37°C, pH 5, 1 h) y térmico (45°C, pH 6, 1 h) en células desarrolladas en anaerobiosis y cosechadas en fase exponencial y estacionaria, sobre la supervivencia a los desafíos

térmicos (HC) y oxidativo OC (Fig. 19). Las variables estudiadas y sus interacciones (fase de crecimiento - estrés moderado) afectaron significativamente ($p < 0,001$) el número total de células sobrevivientes (recuento en WMA + cisteína). Las células en fase estacionaria presentaron mayor resistencia que las células cosechadas en fase exponencial. En particular, se observó mayor supervivencia al desafío térmico ($\log N/N_0 = -0,6$) cuando se aplicó un estrés térmico a células cosechadas en fase estacionaria. Corcoran y col., (2004) demostraron que las células de *L. ramosus* en fase estacionaria fueron más resistentes al secado spray y al almacenamiento a 4°C, 15°C y 37°C que las células cosechadas en fase exponencial.

La supervivencia al HC de las células sometidas a estrés moderado ácido fue considerablemente más alta en fase estacionaria respecto a su control (células no expuestas a un estrés moderado), pero no así para las células en fase exponencial. Parte de la población celular fue dañada en forma subletal y fue incapaz de formar colonias en un medio acidificado (WMA pH 5,5). En fase exponencial, si bien el recuento en WMA acidificado (pH 5,5) fue más alto para las células sometidas a estrés térmico comparado con el recuento de las células control, o de las células con estrés ácido ($p < 0,001$), la supervivencia no fue, bajo ninguna condición, significativamente diferente.

El desafío oxidativo (OC) fue considerablemente más letal que el térmico. La supervivencia más alta ($\log N/N_0 = -1,9$) se observó en células en fase estacionaria con estrés ácido, mientras que la más baja ($\log N/N_0 = -3,1$) en células en fase exponencial con estrés térmico. Tanto la fase de crecimiento (estacionaria > exponencial) como el estrés moderado (ácido > control > térmico) tuvieron un efecto significativo ($p < 0,001$) sobre el total de la supervivencia al OC, mientras que la interacción entre las variables no fue significativa. La proporción de células dañadas fue significativamente ($p < 0,001$) más baja para las células en fase exponencial adaptadas al calor y al ácido que para las células no tratadas.

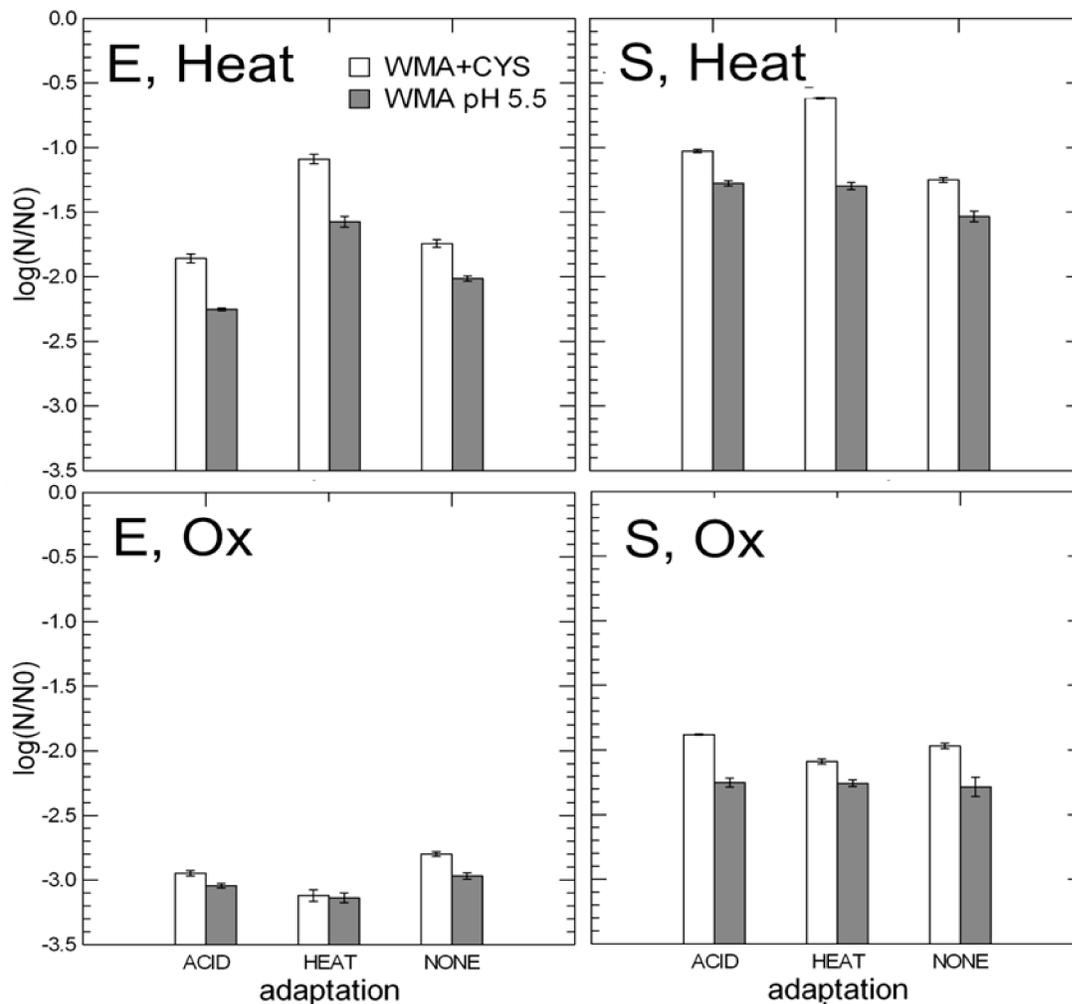


Figura 19: Efecto del desafío térmico (Heat) (55°C, 15 min) y oxidativo (Ox) (0,04 mmol/L H₂O₂, 15 min, 37°C) en la supervivencia de células de *L. rhamnosus* 64 cosechadas en fase exponencial (E) o en fase estacionaria temprana (S), cultivadas en permeado de suero formulado bajo condiciones anaeróbicas y sometidas (adaptación) a estrés moderado (adaptation) con ácido (acid) (HCl 3M) (pH 5, 1h) o a estrés moderado con calor (heat) (45°C, 1h), o sin aplicación de estrés (none). Luego del desafío, las células sobrevivientes fueron enumeradas en WMA + cisteína (células viables + células dañadas subletalmente, barras blancas) y en WMA pH 5.5 (células no injuriadas, barras grises). A mayor altura de la barra, mayor resistencia de la cepa al desafío en particular.

De los resultados obtenidos se puede determinar que para las células cosechadas en fase estacionaria temprana, fue más efectiva la aplicación de un estrés térmico moderado que un estrés oxidativo para prevenir parcialmente el daño causado en el desafío con calor. Esto coincide con el hecho generalmente aceptado según el cual la exposición previa a un factor de estrés, en un nivel subletal, induce una mayor resistencia a posteriores exposiciones a niveles más altos del mismo estrés (Bunning y col., 1990; O'Driscoll y col., 1996). La mayor resistencia de células cosechadas en fase estacionaria se ha asociado con la adaptación al estrés por la limitación de nutrientes (van de Guchte y col., 2002; Santivarangkna y col., 2007) y por la protección cruzada conferida por el bajo pH alcanzado durante el crecimiento en condiciones de pH no controlado (Silva y col., 2005a).

3.4. Cinética de inactivación por calor en células expuestas a estrés ácido moderado.

Debido a que se observó una mayor sensibilidad al desafío térmico de células expuestas a estrés ácido moderado respecto al estrés térmico, se profundizó el análisis de la inactivación por calor mediante el estudio de la cinética implicada en este fenómeno. Dado que la cinética de inactivación de bacterias no formadoras de esporas frecuentemente es del tipo no lineal, la cinética de inactivación durante los desafíos con calor u oxidativo de células sometidas previamente o no a estrés ácido moderado se ajustó usando el modelo de Weibull: $\log(N/N_0) = 2,303 (t/\alpha)^\beta$. El parámetro α es el tiempo característico de inactivación (cuanto más bajo, más rápidamente disminuye la población de sobrevivientes) en tanto el parámetro β es un parámetro de forma: < 1 indica una curvatura ascendente, esto es, una cola; > 1 indica una curvatura descendente esto es, un hombro; 1 indica que el modelo se reduce al modelo clásico exponencial para muerte celular. El tiempo para alcanzar la reducción decimal d (t_d) puede calcularse con: $t_d = \alpha \cdot [-\ln(10^{-d})]^{1/\beta}$. Tanto para desafíos con calor como para el oxidativo la cinética de inactivación fue marcadamente no lineal con una curvatura ascendente (Fig. 20). El modelo Weibull (Tabla 11) proporcionó un ajuste satisfactorio para la mayoría de las

curvas de inactivación (con R^2 que va desde 0,94 a 0,98 y cuadrado medio residual, RMS, yendo de 0,09 a 0,08).

Los valores β fueron <1 (debido a la curvatura ascendente) mostrando la existencia de variabilidad en la tolerancia dentro de la población. El estrés moderado con ácido aumentó la resistencia tanto en la población total como en la dañada (según lo determinado por valores mayores α y t_{2d}) al HC, pero tuvo, en general, un efecto menor en la tolerancia al OC en términos de parámetros de la curva de inactivación.

Tabla 11: Parámetros estimados (\pm error estándar) del modelo de Weibull para supervivencia luego del desafío con calor (HC) u oxidativo (OC) en células de *L. rhamnosus* 64 (producidas en run 20 en anaerobiosis y pH6) cosechadas en fase estacionaria, sometidas (o no: control) a estrés moderado con ácido (1h, pH 5, 37°C). El recuento celular se realizó en WMA + cyst. y en WMA pH 5,5. El cuadrado de la media residual (RMS), R^2 y tiempo para reducir la población en un 99% (t_{2D} , min) están indicados. Sólo se muestran los dígitos significativos.

Medio de cultivo	Estrés	Desafío	Alpha	beta	RMS	R^2	t_{2D}
WMA+cys	No	H	3,4 \pm 0,5	0,74 \pm 0,05	0,014	0,980	27,2
WMA+cys	Acido	H	5,08 \pm 0,04	0,89 \pm 0,05	0,009	0,983	28,3
WMA pH 5,5	No	H	2,8 \pm 0,4	0,69 \pm 0,05	0,017	0,974	25,8
WMA pH 5,5	Acido	H	3,0 \pm 0,3	0,78 \pm 0,04	0,080	0,986	27,5
WMA+cys	No	OX	0,9 \pm 0,3	0,50 \pm 0,06	0,035	0,957	19,7
WMA+cys	Acido	OX	1,00 \pm 0,3	0,51 \pm 0,05	0,035	0,954	19,0
WMA pH 5,5	No	OX	0,6 \pm 0,2	0,47 \pm 0,06	0,047	0,951	16,0
WMA pH 5,5	Acido	OX	0,6 \pm 0,3	0,48 \pm 0,06	0,059	0,935	15,7

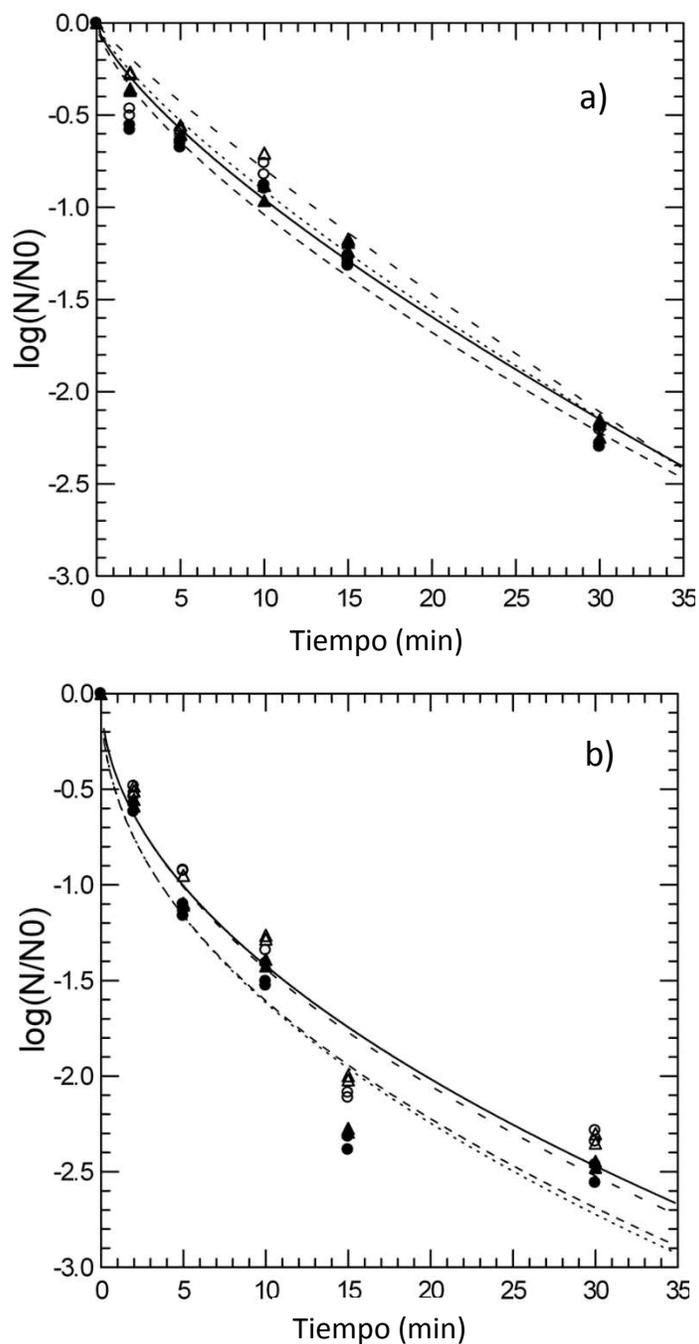


Figura 20: Curva de supervivencia de *L. rhamnosus* 64 en fase estacionaria temprana, durante el desafío con calor (Fig. a, 55°C 15 min) y el desafío oxidativo (Fig. b, 37°C, 0,04 mol/L H_2O_2). ●: control; ▲: estrés moderado con ácido (pH 5, 1 h). Símbolos vacíos: total de sobrevivientes (células cultivables + células dañadas subletalmente) enumeradas en WMA + cisteína; símbolos cerrados: células viables en WMA pH 5,5. Las líneas muestran el ajuste del modelo de Weibull.

3.5. Secado spray en suero de queso y estrés térmico.

Se ha demostrado que la matriz o medio utilizado como soporte durante el secado spray puede tener una marcada influencia sobre la supervivencia y la estabilidad durante el almacenamiento de los cultivos probióticos (Meng y col., 2008). Si bien en el Capítulo 1 se determinó que la matriz suero de queso – almidón era adecuada para el secado spray de la cepa en estudio, en esta etapa del trabajo fueron evaluadas otras combinaciones (utilizando como principal material de pared suero de queso) de modo de ampliar el conocimiento sobre posibles matrices de secado. Se observaron distintas capacidades de supervivencia para los diferentes ingredientes utilizados (almidón, goma arábica, WPC80 o maltodextrina) en combinación con suero de queso, siendo el almidón y la goma arábica los más adecuados con una reducción de la viabilidad celular post secado de aproximadamente 0,5 órdenes log. (Fig. 21). Las diferencias intrínsecas en las temperaturas de transición vítrea de los ingredientes usados podría relacionarse con la diferencia en la capacidad de protección de la viabilidad celular, como indicaron Carvalho y col., (2004) y Aschenbrenner y col., (2012) al estudiar la estabilidad de BAL deshidratadas.

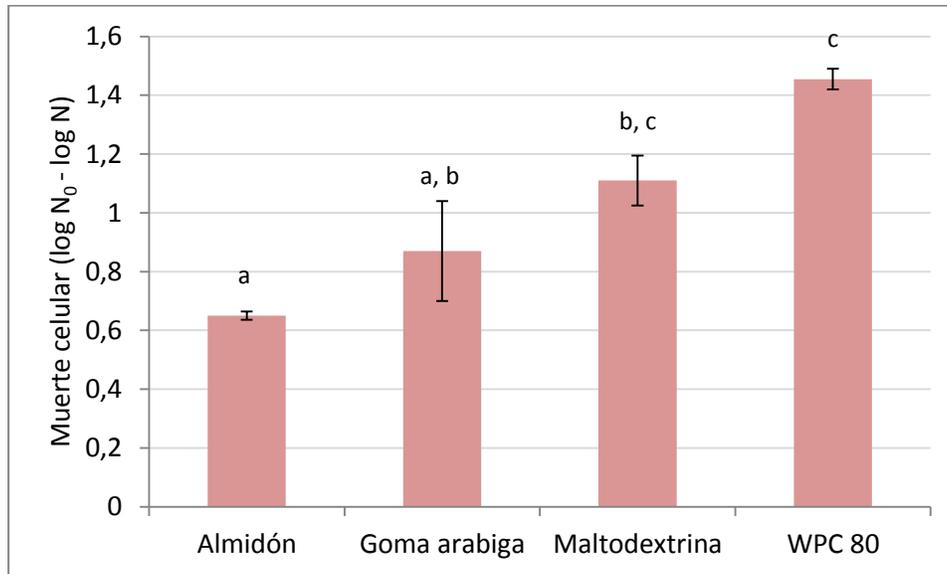


Figura 21: Sobrevida (expresada como muerte celular: diferencia de los logaritmos de UFC/mL antes y después del secado spray de *L. rhamnosus* 64 cosechado en fase estacionaria temprana, secado spray en suero de queso 10% (p/v) combinado con 10% (p/v) de goma arábica, almidón, WPC80, o maltodextrina. ^{a,b,c} Barras con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En el Capítulo 1 no se observaron diferencias en la sobrevida al secado spray cuando la biomasa de la cepa se produjo a pH libre en el medio formulado M2 y se deshidrató en suero de queso – almidón. En esta parte del trabajo, la biomasa se produjo en permeado de suero formulado y a pH constante, observándose una pérdida de viabilidad celular al secado spray en la misma matriz de aprox. 0,5 órdenes logarítmicos. Por un lado, la mayor resistencia observada en el Capítulo 1 podría deberse al hecho de haberse producido la biomasa a pH libre, donde la exposición natural a un factor de estrés, como lo es la acidez láctica, podría haber inducido resistencia cruzada a otro factor de estrés, como lo es el secado spray. Adicionalmente, Saarela y col. (2003) observaron que la resistencia a la digestión gástrica simulada en lactobacilos, dependía de la composición del medio de cultivo donde se había producido la biomasa, debido a la incorporación citoplasmática y en la membrana y pared celular de determinados ingredientes del medio de cultivo. En este contexto, la diferencia en resistencia al secado

spray de la cepa en estudio podría deberse al hecho de haberse desarrollado en medio formulado M2 (Capítulo 1) respecto al permeado de suero formulado (este Capítulo).

Durante el almacenamiento (Fig. 22), la menor reducción en el número de células viables se observó para suero de queso - almidón (0,6 órdenes log) y suero de queso-WPC80 (0,5 órdenes log) en el día 60. En este sentido, la pérdida de viabilidad celular de *L. rhamnosus* 64 a corto plazo (2 meses) observada en esta parte del trabajo, fue del mismo orden (aproximadamente medio orden logarítmico) que la observada en el Capítulo 1 cuando la misma cepa fue producida a pH libre en el medio formulado M2.

A los 120 días, la combinación suero de queso-WPC80 tuvo una menor reducción (0,5 órdenes log) que el resto de las matrices utilizadas.

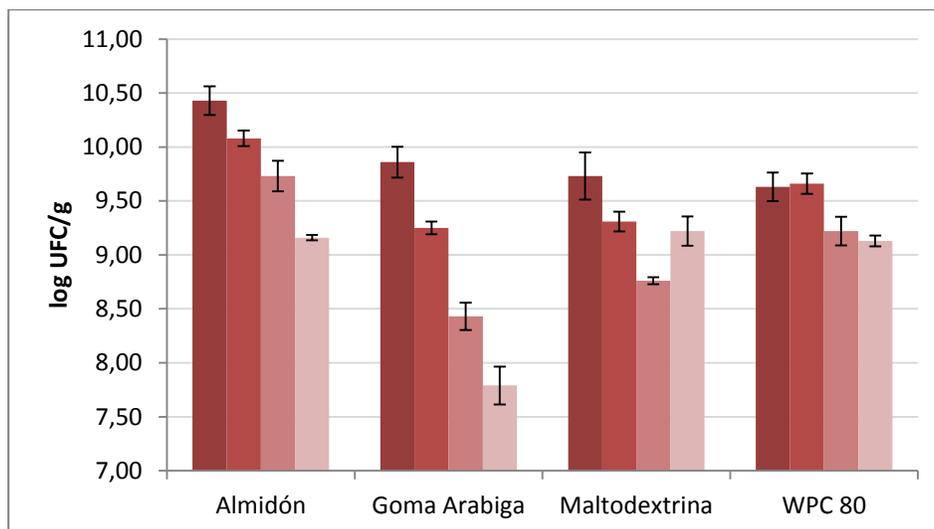


Figura 22: Recuentos de células viables de *L. rhamnosus* 64 secado spray en suero de queso 10% (p/v) combinado con 10% (p/v) de goma arábica, almidón, WPC80 o maltodextrina, luego de 0 (■), 30 (■), 60 (■) y 120 (■) días de almacenamiento a 5°C.

Los resultados obtenidos hasta este punto, junto a algunos aspectos prácticos que deben ser tenidos en cuenta a escala industrial (facilidad de manejo de los ingredientes, disponibilidad, solubilidad, costo, entre otros), y que podrían condicionar un futuro escalado, fueron considerados en conjunto para elegir un tratamiento de estrés moderado y una matriz para el secado por pulverización. Tomando en cuenta la supervivencia a la deshidratación y al almacenamiento durante 120 días, y al mismo tiempo el menor costo del almidón respecto del WPC80, se seleccionó el empleo del suero de queso y almidón (20% de sólidos totales, relación 1:1). En cuanto a la aplicación de diferentes tipos de estrés, se eligió el estrés por calor en lugar del ácido ya que demostró tasas razonablemente similares en la supervivencia al desafío con calor (Fig. 19). Además, a mayor escala, la aplicación de un estrés por calor moderado es tecnológicamente más factible que la acidificación y neutralización de las suspensiones celulares antes del secado por pulverización, ya que no se recomienda llevar adelante la deshidratación a pH bajo porque el polvo obtenido presentaría características indeseables como pegajosidad (Bylund, 1995).

El efecto de la aplicación de un estrés térmico moderado a la biomasa en el fermentador, sobre la viabilidad de los cultivos deshidratados por secado spray en solución de suero de queso-almidón, se observan en la Figura 23. Si bien se observa una muerte celular de aprox. 0,6 órdenes log luego del secado spray independientemente de la aplicación del tratamiento térmico moderado, el efecto positivo de este tratamiento sobre la reducción de la muerte celular se comienza a observar a partir de los 60 días de conservación, incrementándose la diferencia de muerte celular con y sin tratamiento térmico a medida que avanza el tiempo de conservación, siendo la muerte celular del doble de magnitud hacia los 180 días en los cultivos control respecto a los tratados térmicamente.

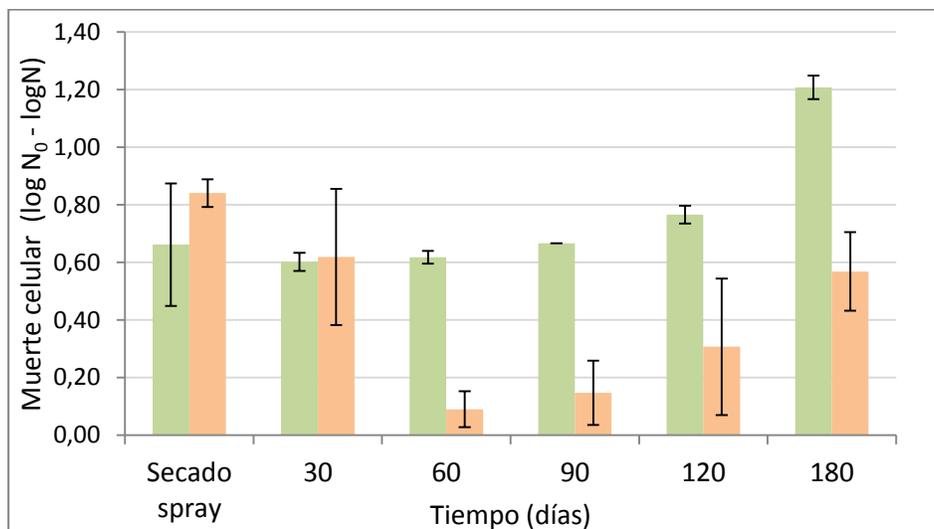


Figura 23: Sobrevida (expresada como muerte celular) de *L. rhamnosus* 64 secado spray en suero de queso-almidón (10% - 10% p/v) y conservado a 5°C. Las células fueron sometidas (■) o no (■) a un estrés térmico moderado (45°C, 1 h) previo al secado spray.

Con el objeto de determinar si condiciones más severas de calor o ácido, o la aplicación combinada de estos factores de estrés, mejorarían la supervivencia al secado spray de células en fase estacionaria, se aplicó un tratamiento térmico de 52°C por 15 min, un tratamiento ácido (pH 4, 60 min, 37°C) o una combinación de ambos (52°C, 15 min, pH 4) previo al secado spray en suero de queso - almidón (20% de sólidos totales, relación 1:1). Se observó una mayor mortalidad de células luego del secado spray comparado con la aplicación de menores niveles de estrés, estudiado previamente. Además, el estrés ácido y la combinación estrés ácido y térmico indujeron reducciones muy significativas en los recuentos de células viables (Tabla 12), por lo que no se consideró esta alternativa y no se monitoreó la viabilidad durante la conservación de los cultivos.

Tabla 12: Efecto de la aplicación de un estrés térmico (52°C, 15 min), ácido (pH 4, 60 min, 37°C) o la combinación de ambos (52°C, 15 min, pH 4) sobre la sobrevivencia de *L. rhamnosus* 64 al secado spray en suero de queso – almidón (10% - 10% p/v).

Muerte celular (diferencia en log UFC/ mL antes y después del secado spray)			
Control	Térmico	Ácido	Combinado
1,21 ± 0,18 ^a	1,73 ± 0,11 ^b	2,17 ± 1,72 ^c	2,05 ± 0,42 ^c

^{a,b,c} Media ± desviación estándar. Valores con diferentes letras indican diferencia significativa (p < 0,05).

4. CONCLUSIONES PARCIALES.

La suplementación de permeado de suero con extracto de levadura, triptona, Tween 80, Mg-Mn permitió la producción de aproximadamente 10^{10} UFC/mL de células de *L. rhamnosus* 64 en fermentación a pH 6 controlado, en anaerobiosis. Para todas las condiciones evaluadas, las células de la cepa en estudio fueron más sensibles al desafío oxidativo que al desafío térmico. La tolerancia al desafío térmico y oxidativo fue aún menor en *L. rhamnosus* 64 cuando la cepa fue desarrollada en aerobiosis y cosechada en fase exponencial. La incubación anaeróbica, la cosecha de células en fase estacionaria de desarrollo y la aplicación de un estrés térmico moderado resultaron efectivos para reducir la muerte celular al desafío con calor. En cuanto a las estrategias tecnológicas evaluadas para mejorar la performance de la cepa durante el proceso de deshidratación y conservación en el tiempo, la utilización de diferentes matrices permitió determinar la posibilidad de avanzar en la microencapsulación de *L. rhamnosus* 64 en suero de queso y almidón. La aplicación de un estrés térmico moderado, directamente sobre la biomasa en fermentador, tuvo un efecto positivo sobre la viabilidad celular a los 180 días de almacenamiento del cultivo deshidratado. La pérdida de viabilidad celular durante la conservación a largo plazo (180 días) fue de aproximadamente 1,2 órdenes log y tuvo una componente inmediata debido al secado spray (de aprox. 0,6 órdenes log) y otra componente de muerte celular a lo largo del almacenamiento de igual magnitud.

Capítulo III: Estudio de la capacidad funcional *in vivo* de *L. rhamnosus* 64 y efecto del secado spray.

1. INTRODUCCIÓN.

El cuerpo humano se encuentra íntimamente asociado con billones de microorganismos, principalmente bacterias, que forman parte de la microbiota comensal. La presencia y la actividad de dichas bacterias son de vital importancia para el individuo, pues de ellas depende la salud y el bienestar del ser humano (De Preter y col., 2011). En particular, el tipo de bacterias que colonizan el intestino de los recién nacidos va a determinar la modulación de su sistema inmunitario pues actúan como importantes estímulos antigénicos en el proceso de maduración de la respuesta inmune intestinal (Tiihonen y col., 2010). En el tracto intestinal ocurren el mayor número de interacciones entre el sistema inmunitario del huésped y los componentes de la microbiota. Una de las características clave del sistema inmunitario intestinal es la habilidad de distinguir entre bacterias simbióticas y patogénicas y por ello, proteger frente a la infección mientras actúa modulando respuestas inflamatorias exacerbadas frente a la microbiota residente (Feng y Elson, 2011).

Para el correcto funcionamiento y defensa del organismo, es necesario que se establezca un equilibrio entre el sistema inmunitario intestinal y la microbiota (Van den Abbeele y col., 2011). La alteración de este balance desencadena desórdenes inflamatorios crónicos (Hansen y col., 2010) como la enfermedad inflamatoria intestinal y alergias alimentarias. La microbiota intestinal tiene un efecto condicionador sobre la homeostasis del intestino, entregando señales que regulan el epitelio, el sistema inmune de la mucosa y la actividad neuromuscular del intestino (Quera y col., 2005).

Los probióticos pueden contribuir al bienestar y la salud del hospedador, ya que estos microorganismos representan una herramienta efectiva en el control y prevención de ciertas enfermedades (Kim y col., 2006), al menos de forma parcial. Se han propuesto varios mecanismos por los que estos microorganismos, que actúan principalmente en el tracto gastrointestinal, podrían ser capaces de tratar o prevenir desórdenes intestinales, como la reducción del pH, la contribución a la reparación de la mucosa (Hickson y col.,

2007), competición con patógenos, secreción de sustancias antimicrobianas y la estimulación del sistema inmunitario (Servin, 2004). Estos mecanismos de interacción huésped-microorganismos implican un contacto físico entre ellos y el epitelio intestinal, vía adhesión a la mucosa y a células epiteliales para la estimulación de la secreción de mucus, producción de moléculas de defensa y refuerzo de la barrera intestinal (interacción sistema inmunitario-bacteria); también un contacto bacteria-bacteria vía la exclusión e inhibición de patógenos por secreción de sustancias antimicrobianas y competición por nutrientes (Collado y col., 2010).

Los probióticos pueden actuar sobre la componente innata del sistema inmune mediante la activación de células como los fagocitos, macrófagos y las células natural killer (NK), que se espera tengan un efecto inhibitorio contra infecciones y ciertos tipos de cánceres. Por otro lado también pueden controlar respuestas inmunitarias exacerbadas, ejerciendo un efecto inhibitorio o moderador sobre enfermedades inflamatorias del intestino, alergias y enfermedades autoinmunes. Múltiples mecanismos se han propuesto para dar cuenta de la expresión de las actividades antiinflamatorias, incluyendo: la inhibición de la producción de mediadores proinflamatorios, tales como IL-8, inducción de la producción de citoquinas anti-inflamatorias, tales como IL-10, y la inducción de células T reguladoras (Chiba y col., 2009). Más allá del sistema inmune asociado a la mucosa intestinal, los probióticos influyen positivamente en la composición y la actividad de los microorganismos en el intestino y ayudan a mantener un equilibrio benéfico de la microbiota intestinal (Malaguarnera y col., 2012). Se considera que las bacterias probióticas, administradas por vía oral, interactúan con el sistema inmune ingresando a través de las células M ubicadas en el epitelio que cubre las placas de Peyer (PP) para interactuar con macrófagos y células dendríticas (CDs), por otro lado las CDs en la lámina propia de la mucosa extienden sus dendritas para muestrear microorganismos intraluminales, y finalmente los probióticos lumbales estimulan a las células epiteliales para la producción de factores humorales que afectan indirectamente a las células del sistema inmune intestinal (Chiba y col., 2009). Muchos de los efectos inducidos por los probióticos dependen de la interacción del microorganismo con la célula dendrítica, dada

la capacidad que tiene de polarizar la respuesta inmunológica adaptativa. El efecto sobre la maduración de esta célula presentadora de antígeno y en su producción de citoquinas depende de la cepa probiótica, observándose casos de inhibición o estimulación de la producción de citoquinas IL-10 e IL-12, lo cual puede favorecer un estado de tolerancia o una respuesta inmune Th1, respectivamente (Fink y col., 2007).

Las bacterias comensales proveen una resistencia contra la colonización de potenciales patógenos mediante la ocupación de los nichos disponibles (inhibición competitiva de los sitios de unión) y a través de factores de regulación autogénica (síntesis de ácidos grasos, peróxido de hidrogeno y bacteriocinas) (Schmid y col., 2006). Además, influyen profundamente el desarrollo de los componentes humorales del sistema inmune de la mucosa intestinal: el número de células productoras de IgA aumenta progresivamente en respuesta al establecimiento de la microbiota (O'Hara y Shanahan, 2006). Algunos probióticos poseen potentes propiedades antibacterianas y antivirales (incluyendo la estimulación de la producción de interferón). La actividad antibacteriana de los probióticos puede derivar de la secreción directa de bacteriocinas, la elaboración de proteasas dirigidas contra las toxinas bacterianas o a través de su capacidad para adherirse a las células epiteliales y por lo tanto excluir patógenos (Quigley y Flourie, 2007). El efecto benéfico depende de la cepa utilizada, la dosis, la forma de administración, el formato tecnológico y la matriz en la que se lo administra, así como de características inherentes al huésped (Aureli y col., 2011).

Debido a que los procesos industriales de fabricación de cultivos deshidratados, ya sea para utilizarlos como suplementos farmacéuticos o para incorporarlos en alimentos, pueden alterar significativamente las propiedades estructurales y funcionales de los microorganismos probióticos (Iaconelli y col., 2015), se requieren estrategias para preservar a largo plazo la viabilidad y funcionalidad de estas bacterias, ya que se demostró que los procesos de secado pueden afectar la capacidad inmunomoduladora de ciertas cepas de bacterias probióticas (Paez y col., 2013; Iaconelli y col., 2015).

OBJETIVO.

El objetivo de este capítulo fue evaluar la funcionalidad de *L. rhamnosus* 64 mediante ensayos *in vivo* utilizando la cepa como cultivo fresco o deshidratada por secada spray en suero de queso – almidón.

CAPITULO III-a: Capacidad inmunomoduladora en intestino.

1. INTRODUCCIÓN.

En los últimos 20 años el uso de probióticos ha proliferado considerablemente y se han obtenido importantes avances en la selección y caracterización de cultivos específicos y en la comprobación de los efectos benéficos que presenta el consumo de los mismos para la salud (Floch, 2014). De estos estudios, cepas específicas de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* han recibido la mayor atención por su versatilidad para el manejo industrial y sus efectos funcionales, principalmente a nivel de la mucosa intestinal, y se han reportado numerosos ensayos *in vitro* en líneas celulares e *in vivo* en animales, seguidos en algunos casos de ensayos clínicos en humanos. De los ensayos en animales, el modelo murino es ampliamente utilizado para estudios de inmunomodulación a nivel intestinal y se ha reportado un considerable número de estudios en los que la administración de determinadas cepas de lactobacilos y bifidobacterias aumentaron la producción de IgA secretoria en el lumen, el número de células productoras de IgA o bien produjeron modificaciones en los perfiles de citoquinas (Vinderola y col., 2007, de Moreno de LeBlanc y col., 2008, Mileti y col., 2009, Castillo y col., 2011, Souza y col., 2012). Además se han explorado tanto el beneficio inmunológico como los mecanismos involucrados, utilizando una gran variedad de marcadores inmunológicos como inmunoglobulinas (IgA, IgG), receptores tipo Toll (sitios de reconocimiento de antígenos), marcadores de integridad de la mucosa, marcadores de la inmunidad innata (células NK, fagocitos, neutrófilos, monocitos) y citoquinas (pro y anti-inflamatorias) (Malaguarnera y col., 2012).

Se ha descrito que los probióticos pueden modular la respuesta inmune en animales y humanos no sólo a nivel de la mucosa intestinal, sino también a nivel sistémico. Dadas sus propiedades inmunomoduladoras, actualmente se evalúa la utilidad de los probióticos en el manejo preventivo o terapéutico de enfermedades inflamatorias. El consumo de probióticos podría tener un efecto positivo en la salud humana en algunas situaciones que pueden alterar el balance de la microbiota intestinal e influir en la respuesta inmune del individuo, tales como la alimentación con fórmulas infantiles, el tratamiento con antibióticos, los cambios fisiológicos relacionados con el envejecimiento,

las enfermedades gastrointestinales y el estrés (Nova y col., 2007). Los mecanismos de interacción de los probióticos con las células del sistema inmune son diversos. En el caso de las bacterias ácido lácticas, se ha observado que pueden ser captadas por las células M presentes en el epitelio y facilitar la estimulación del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (Fink y col., 2007).

Debido a que la mucosa del tracto gastrointestinal es una de las mayores interfaces entre el hospedador y el ambiente, ésta es sometida continuamente a una alta carga antigénica. Su tejido linfoide asociado (GALT, según su sigla en inglés) debe ser capaz de montar respuestas protectoras contra los organismos invasores y al mismo tiempo mantener un estado de no respuesta o tolerancia hacia los antígenos de su entorno, propios o no dañinos, como las bacterias comensales y los antígenos dietarios (Suzuki y col., 2007). Para ser capaz de responder a estas necesidades del organismo, la respuesta inmune de la mucosa difiere de la respuesta inmune humoral sistémica en varios aspectos. En primer lugar, la inmunoglobulina A (IgA) es el isotipo de anticuerpo predominante en la mucosa intestinal, es producida por las células B de la lámina propia una vez diferenciadas a células plasmáticas, secretada en forma de dímero y transportada a través del epitelio mucoso por una proteína receptora de inmunoglobulinas poliméricas, también conocida como componente secretorio (CS). La IgA actúa previniendo que antígenos luminales penetren la superficie intestinal, siendo capaz de neutralizar toxinas y organismos infecciosos además de regular la composición de la microbiota intestinal y limitar la inflamación local inducida por algunos patrones moleculares asociados a patógenos (Wershil y Furuta, 2008).

La IgA es uno de los factores de defensa humoral más importante de las superficies mucosas (Lamm y col., 2002). El estudio de la capacidad de cepas de bifidobacterias y bacterias lácticas de promover la proliferación de células productoras de IgA o la excreción de IgA secretoria es una medida de su funcionalidad y las convierte en candidatas para emplearse como cultivos probióticos por la relación positiva entre IgA y defensas naturales (Perdigón y col., 2004).

OBJETIVO.

En este capítulo se evaluó en un modelo *in vivo*, la capacidad de *L. rhamnosus* 64 de estimular la respuesta inmune mediada por IgA, citoquinas y actividad fagocítica. La cepa se administró como cultivo fresco y secado spray, para analizar la influencia del proceso de deshidratación y determinar si el perfil funcional de la cepa se modifica con el mismo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Microorganismo.

Se utilizó *L. rhamnosus* 64 como cultivo fresco y secado spray en suero de queso - almidón 20% (p/v). Las condiciones de secado spray utilizadas fueron T° entrada: 140°C, T° salida: 80°C, caudal de alimentación: 6 mL/min (mini secadero spray Büchi B-290). El cultivo fresco para administrar vía oral a los ratones se preparó diariamente a partir de un cultivo *overnight* (16 h) de la cepa lavado dos veces con PBS (6000 rpm, 10 min, 5°C) y resuspendido en suero de queso - almidón (20% (p/v)). El cultivo secado spray en suero de queso - almidón 20% (p/v) se preparó reconstituyendo el cultivo deshidratado al 20% (p/v) en PBS estéril. La suspensión se incubó 15 min en baño maría a 37°C para su disolución completa, con intervalos de agitación en vortex.

2.2. Animales y alimentación.

Se utilizaron 45 ratones machos BALB/c de 6 semanas de edad (20 ± 1 g) provenientes de la colonia cerrada del Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (IciVet-Litoral) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe). Los animales se alojaron en el bioterio del INLAIN (UNL-CONICET) en cajas de plástico transparentes en grupos de 5

animales/jaula y se mantuvieron a $21 \pm 1^\circ\text{C}$, con una humedad ambiente de $55 \pm 2\%$, y ciclo luz/oscuridad de 12 h. Los animales recibieron *ad libitum* alimento balanceado convencional (Cooperación, Buenos Aires, Argentina) y agua de red y se aclimataron por un período de 7 días previos al ensayo. Los animales fueron tratados según la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Experimentación del National Institute of Health (NIH, USA) y los ensayos fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL (Esperanza, Santa Fe, Argentina).

Se administró la cepa *L. rhamnosus* 64 por intubación intragástrica (10^8 UFC/día/animal) durante 3, 6 y 10 días consecutivos como cultivo fresco o secado spray en suero de queso - almidón y reconstituido al 20% (p/v) de sólidos totales. Como control se utilizó un grupo de animales intubados diariamente y durante 10 días con suero de queso - almidón 20% (p/v). Al final del período de alimentación, los animales fueron pesados, anestesiados intraperitonealmente con un cocktail (0,2 mL/animal) de ketamina/ xilacina/ acepromacina y sacrificados por dislocación cervical.

2.3. Actividad fagocítica y cuantificación de IgA secretoria en contenido intestinal.

Se obtuvieron macrófagos peritoneales por lavado de la cavidad peritoneal para determinar la actividad fagocítica (ensayo de fagocitosis) y el fluido de intestino delgado (lavado por triplicado del intestino delgado) para evaluar la concentración de IgA secretoria (ELISA).

2.3.1 ACTIVIDAD FAGOCÍTICA.

Los macrófagos peritoneales se obtuvieron por lavado de la cavidad peritoneal con 5 ml de PBS (estéril) conteniendo 10 U/mL de Heparina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) y 0,1% (p/v) de albúmina sérica bovina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.). La

suspensión de macrófagos se centrifugó (500 x g, 10 min, 5°C), se lavó con el mismo buffer y se ajustó la concentración a 10⁶ macrófagos/mL en cámara de Neubauer.

Una suspensión de *Candida albicans* (10⁷ células/mL) fue inactivada térmicamente (100°C, 15min) y opsonizada mediante agregado de 10% (v/v) de suero sanguíneo de ratón e incubación por 15 min a 37°C. Se mezclaron 100 µL de la suspensión de macrófagos con 100 µL de la suspensión de levadura opsonizada y se incubó en baño termostático durante 30 min a 37°C. El porcentaje de fagocitosis se expresó como el % de macrófagos activados (aquellos con al menos una célula de levadura fagocitada) después de contar al menos 100 células de macrófagos usando un microscopio óptico (Nikon Eclipse).

2.3.2 CUANTIFICACIÓN DE IGA SECRETORIA EN CONTENIDO INTESTINAL.

Se recuperó el contenido intestinal presionando suavemente el intestino delgado desde el duodeno al íleo distal, se pesó y se diluyó 1:4 en PBS suplementado con 1% (v/v) de un cocktail inhibidor de proteasas (P8340, Sigma, St. Louis, MO, USA). Luego de centrifugarse (2000 x g, 30 min, 4°C) se recogió el sobrenadante y se congeló a -70°C para cuantificación de IgA-S por ELISA de captura, según Rodríguez y col. (2000), utilizándose un anticuerpo anti-IgA de ratón obtenido en cabra (M-8769, Sigma).

2.4. Enumeración de células productoras de IgA.

Se removieron porciones de intestino delgado, se fijaron en solución de formaldehído bufferada, se deshidrataron en una serie de alcohol y xilenos y se incluyeron en parafina, según Vinderola y col. (2005). El número de células productoras de IgA (IgA+) se determinó en cortes histológicos de íleo (excluyendo placas de Peyer) mediante inmunofluorescencia directa, empleando un anticuerpo monoespecífico anti-cadena α de IgA de ratón (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Matar y col., 2001). Los cortes fueron desparafinados y rehidratados en una

serie de concentraciones decrecientes de etanol (desde alcohol absoluto a alcohol 70°), y luego tratados con una dilución (1/100) del anticuerpo en PBS e incubados en oscuridad a 37°C durante 30 minutos. Luego las muestras fueron lavadas dos veces en buffer PBS y examinadas con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse, utilizando una lámpara de mercurio). Los resultados se expresaron como número de células positivas (células fluorescentes)/10 campos y se reportaron como el promedio de tres recuentos, cada uno en un corte histológico diferente, para cada animal.

2.5 Determinación de citoquinas.

Se obtuvieron porciones de intestino delgado y grueso (80 - 120 mg) y se almacenaron congeladas (-70°C) para la determinación de citoquinas. Las muestras fueron homogeneizadas (Ultra Turrax T8, Ika Labortechnik, Staufen, Alemania) en buffer PBS conteniendo 1% (v/v) un cocktail de inhibidor de proteasas (Sigma), EDTA (10 mmol/L, Sigma) y Tween 20 (0,05% v/v, Sigma) y en una proporción de 1 mL PBS/100 mg tejido. Los homogenatos fueron luego centrifugados (10000 rpm, 10 min, 4°C) y los sobrenadantes fueron recogidos y almacenados a -70°C para la cuantificación de citoquinas. La concentración de IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ y TNF- α se determinó por ELISA utilizándose anticuerpos comerciales (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) y de acuerdo a los procedimientos suministrados por el fabricante.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La realización de estudios *in vivo* para evaluar la seguridad y funcionalidad de nuevos aislamientos de potenciales probióticos para consumo humano es un prerrequisito para el desarrollo de alimentos funcionales o suplementos farmacéuticos probióticos (FAO/WHO, 2002). En relación a la activación de la respuesta inmune se evaluaron: la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales (medida de la respuesta inmune sistémica), niveles de IgA secretoria en contenido intestinal y el número de células

productoras de IgA en lámina propia de intestino delgado y la concentración de citoquinas en homogenato de intestino (medidas de la respuesta inmune local).

3.1. Actividad fagocítica de macrófagos peritoneales.

La actividad fagocítica de macrófagos peritoneales es un parámetro útil para evaluar la activación de la respuesta inmune innata en sitios distantes al intestino cuando se administran probióticos. Cuando se evaluó el efecto de la administración oral de *L. rhamnosus* 64 a ratones BALB/c se observó un aumento significativo ($p = 0,000$) de la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales (Fig. 24) en los animales que recibieron el cultivo fresco ($23,3 \pm 1,8\%$) o secado spray ($21,6 \pm 1,7\%$) durante 3 días consecutivos, respecto al control ($12,4 \pm 0,8\%$). No se observaron diferencias en los valores de % de fagocitosis en relación al hecho de haber administrado la cepa como cultivo fresco o secado spray

El consumo de *L. gasseri* y *L. coryniformis* por 2 semanas aumentó la actividad fagocítica de monocitos o neutrófilos en sujetos saludables (Vanderhoof y col., 1999). Mientras que la eliminación de alimentos fermentados en la dieta de voluntarios sanos por dos semanas disminuyó la actividad fagocítica de leucocitos (Yan y col., 2004). Al respecto, es importante tener en cuenta la dosis consumida porque es un factor determinante en los efectos deseados (Yan y col., 2004). Resulta de interés destacar el carácter de “inmediatez” y la relativa corta duración de la respuesta inmune sistémica inducida, en relación a la respuesta local observada en intestino para IgA (ver resultados más adelante), fenómeno que ya había sido observado en trabajos previos (Vinderola y col., 2005). En el presente trabajo y en el trabajo referenciado, la activación de los macrófagos tuvo lugar a corto plazo (luego de 3 días del comienzo de la administración de la cepa en estudio) y retornó al estado de homeostasis o equilibrio, también rápidamente, a diferencia de lo que se observó para la IgA (Fig. 25).

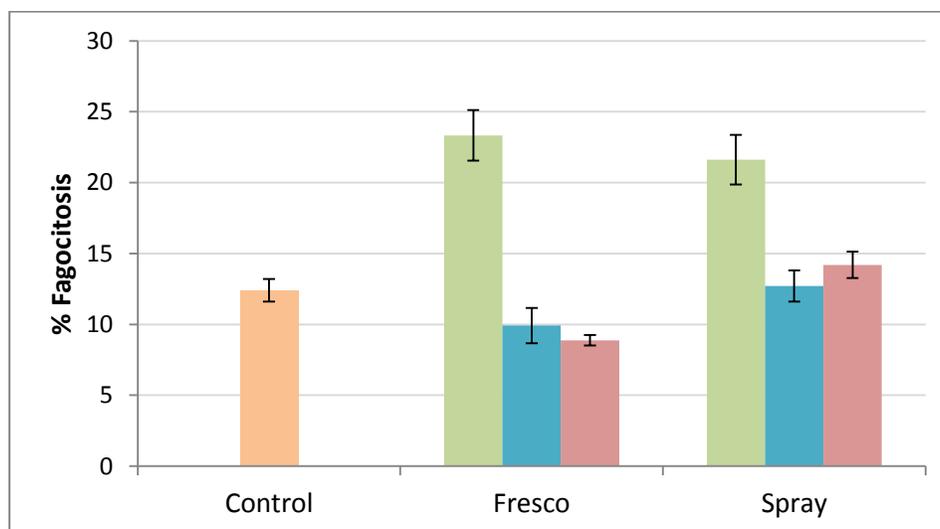


Figura 24: Actividad fagocítica de macrófagos peritoneales en animales que recibieron el cultivo de *L. rhamnosus* 64 fresco o secado spray durante 3 (■), 6 (■) y 10 (■) días consecutivos, respecto al control de bioterio. Valores promedio \pm SEM.

3.2 Cuantificación de IgA intestinal.

La inmunoglobulina A (IgA) es el isotipo más abundante a nivel de las mucosas y su función principal en el intestino es ejercer la exclusión inmune de patógenos y proteínas extrañas mediante una cooperación íntima con los mecanismos de inmunidad innata no específicos (Macpherson y col., 2001). Un aumento en sus niveles es una característica deseada luego de la administración de microorganismos que se espera ejerzan efectos probióticos. En este sentido, se determinó la concentración de IgA secretoria total (ELISA) en contenido de intestino delgado (Fig. 25). Se observó un aumento significativo, respecto al control ($51,7 \pm 9,9 \mu\text{g/mL}$), de IgA secretoria en animales que recibieron el cultivo fresco durante 6 días ($121,2 \pm 6,0 \mu\text{g/mL}$) y 10 días ($97,4 \pm 9,9 \mu\text{g/mL}$) consecutivos ($p = 0,000$ y $0,021$, respectivamente) y en animales que recibieron el cultivo secado spray durante 3 días consecutivos ($102,6 \pm 19,8 \mu\text{g/mL}$) ($p = 0,01$).

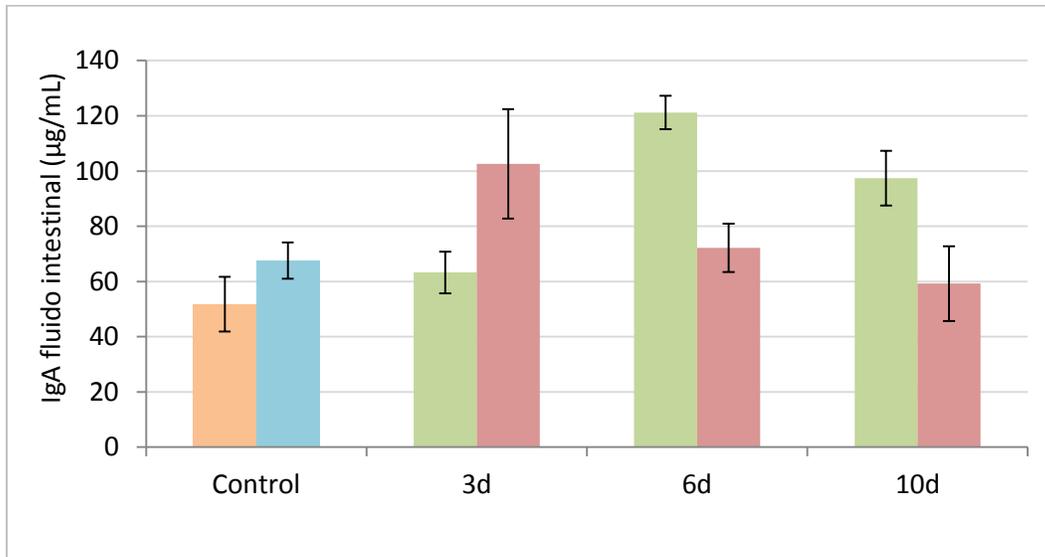


Figura 25: IgA secretoria en fluido intestinal de animales que recibieron el cultivo de *L. rhamnosus* 64 fresco (■) o secado spray (■) durante 3, 6 y 10 días consecutivos, respecto al control de bioterio (■) y de animales control (■) que recibieron solución de queso-almidón (20% p/v). Valores promedio \pm SEM.

En este caso, si bien ambas formas de administración lograron el aumento de niveles de IgA-S a nivel intestinal, la dinámica fue diferente y dependiente del tratamiento tecnológico, es decir, el hecho de que el cultivo haya sido administrado fresco (aumento para 6 y 10 días de administración) o secado spray y reconstituido (3 días de administración). Este cambio en la cinética de producción de IgA fue observado previamente tanto para microorganismos probióticos (Páez y col., 2013) como para ingredientes solubles secados spray (Burns y col., 2010). Si bien la naturaleza de esta modificación de la respuesta del cultivo fresco respecto al secado spray no ha sido determinada, podría tener que ver con cambios conformacionales que sufrirían las proteínas de la pared celular de la cepa luego del secado spray, lo que condiciona su capacidad de interacción con las células presentadoras de antígeno, modificando su efecto sobre la respuesta inmune. A pesar de desconocer los mecanismos, estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de llevar adelante los estudios funcionales con la cepa bajo el formato tecnológico en cuestión, ya que la funcionalidad es susceptible de ser modificada por tratamientos tecnológicos (Vinderola y col., 2001), en particular los

procesos de deshidratación (Iaconelli y col., 2015), respecto a la observada para cultivos frescos obtenidos en condiciones de laboratorio.

El estudio por inmunohistoquímica del número de células productoras de IgA (Fig. 26) demostró que *L. rhamnosus* 64 fue capaz de inducir la proliferación de células IgA+ a nivel de la lámina propia a lo largo del intestino. Tanto el cultivo fresco como el secado spray fueron capaces de inducir un aumento significativo del N° de células IgA+ respecto a los controles ($p < 0,05$), para todos los períodos de administración evaluados. No se observaron diferencias significativas entre los días de administración ni entre el cultivo fresco y secado spray.

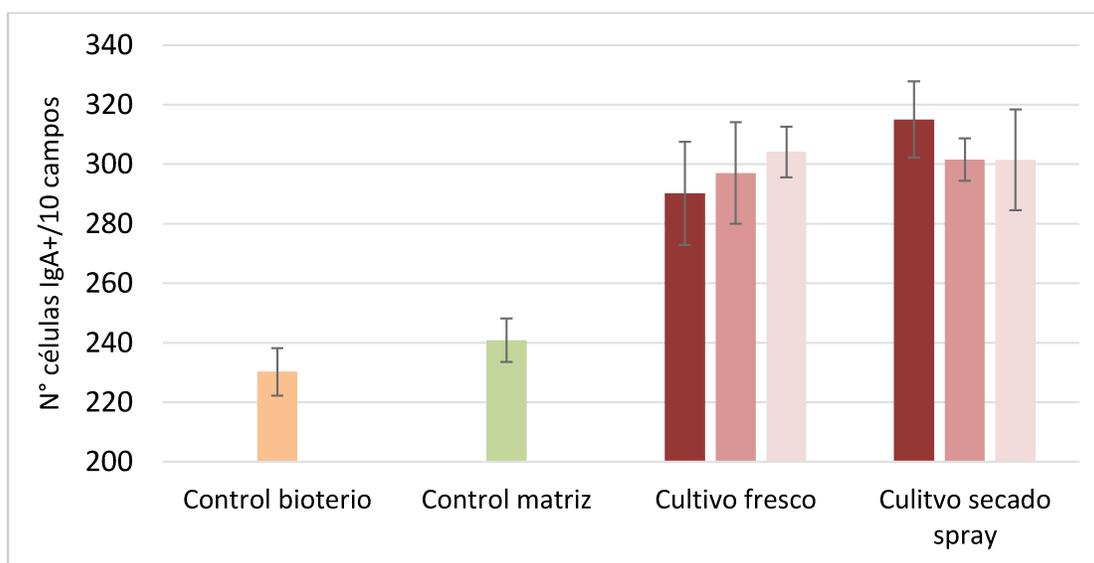


Figura 26: Efecto de la administración oral de *L. rhamnosus* 64, durante 3 (■), 6 (■) y 10 (■) días consecutivos, como cultivo fresco o secado spray (y reconstituido) en el número de células productoras de IgA en lámina propia de intestino delgado (ID) de ratones BALB/c, comparado con ratones control de bioterio (■) y de animales control (■) que recibieron solamente la matriz de secado. Valores promedio \pm SEM.

Si bien la promoción de IgA a nivel intestinal es un parámetro de interés para determinar la capacidad funcional de un cultivo potencialmente probiótico, no ha sido propuesto hasta el momento un protocolo estandarizado para tal fin ni si es más conveniente que se determine mediante la cuantificación por ELISA de IgA-S o el conteo por

inmunohistoquímica de la proliferación de células productoras de IgA a nivel de lámina propia de intestino. Mientras el test de ELISA cuantifica los niveles de IgA-S (dimérica) soluble en el contenido intestinal, la inmunohistoquímica cuantifica células plasmáticas que poseen la molécula de IgA como receptor de membrana y que son las responsables de secretar las moléculas de IgA hacia el lumen intestinal (Macpherson y col., 2012). Si bien la proliferación de esta población celular en la lámina propia de la mucosa y la excreción de IgA dimérica hacia la luz del espacio intestinal (lumen) son dos fenómenos ligados o consecuentes, no se han reportado estudios de este fenómeno utilizando ambas metodologías al mismo tiempo (ELISA e inmunohistoquímica). En este trabajo, se observó aumento del número de células productoras de IgA en intestino delgado tanto para el cultivo fresco como para el cultivo secado spray para los 3 períodos de administración evaluados, sin embargo, esto se tradujo en un aumento de la IgA-S en intestino delgado para los 6 y 10 días de administración del cultivo fresco o para 3 días de administración del cultivo secado spray. Esta falta de correlación directa entre una forma y otra de cuantificar el fenómeno tampoco posee un mecanismo claro hasta el momento, aunque podría estar ligado en parte al hecho de que la vida media de las células plasmáticas IgA+ es de aproximadamente 5 días en la lamina propia (Cerutti y col., 2008), mientras que la IgA-S está más condicionada al arrastre y eliminación en heces debido a los movimientos peristálticos. De todos modos, se subraya una vez más la importancia de realizar los estudios funcionales con el formato tecnológico del cultivo en desarrollo como así también el hecho de emplear la mayor cantidad de herramientas posibles para estudiar un mismo fenómeno desde diferentes puntos de vista, el cual podría interpretarse de forma diferente según se use una técnica (ELISA) u otra (inmunohistoquímica). Cabe señalar que la utilización de otras técnicas, como la citometría de flujo en poblaciones celulares aisladas de lámina propia o la RT-PCR de mRNA, podrían incluso revelar otros aspectos funcionales de la cepa, y la influencia de su formato tecnológico, que podrían pasar desapercibidos empleando las técnicas utilizadas en esta parte del estudio.

3.3 Determinación de citoquinas.

Las citoquinas (también denominadas citocinas) son péptidos de bajo peso molecular que regulan la función de las células inmunes que las producen y actúan

además sobre otras poblaciones celulares. Son los agentes responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, poseen funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. Son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares, células endoteliales y epiteliales, adipocitos, células del tejido muscular (miocitos) y del tejido conjuntivo. Más allá de la activación de macrófagos peritoneales y la inducción de aumentos de los niveles de IgA, la administración de microorganismos probióticos tiene efecto sobre las citoquinas, aunque en este caso es más compleja la relación entre la administración de los probióticos y la expresión de citoquinas, no existiendo siempre una correlación directa esperable o deseable que sugiera un efecto benéfico. Uno de los principales mecanismos de protección de los probióticos frente a infecciones gastrointestinales, es vía la modulación de citoquinas pro-inflamatorias (como IFN- γ y TNF- α), y en el caso de patologías inflamatorias, la inducción de la síntesis de citoquinas reguladoras o anti-inflamatorias, como la IL-10 (Mileti y col., 2009). Los niveles de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10, fueron evaluados en homogenatos de intestino delgado (ID) e intestino grueso (IG) mediante ELISA. En intestino delgado no se observaron diferencias significativas para IL-2, IL-6 e IL-10, para ninguno de los períodos de administración evaluados (3, 6 y 10 días) cuando se administró el cultivo fresco o secado spray, respecto al control (Fig. 27). La expresión de TNF- α fue significativamente menor al control de bioterio (3477 ± 277 pg/g) después de administrar el cultivo fresco por 10 días (1675 ± 364 pg/g) y el cultivo secado spray por 3 días (1938 ± 422 pg/g) ($p = 0,006$ y $0,019$ respectivamente) (Fig. 27). La síntesis de IFN- γ en el grupo control de bioterio fue de $88,5 \pm 25,4$ pg/g y se observó un aumento significativo cuando se administró el cultivo fresco ($262,5 \pm 43,2$ pg/g) y secado spray ($292,8 \pm 52,7$ pg/g) durante 10 días consecutivos ($p = 0,058$ y $p = 0,012$ respectivamente) (Fig. 27).

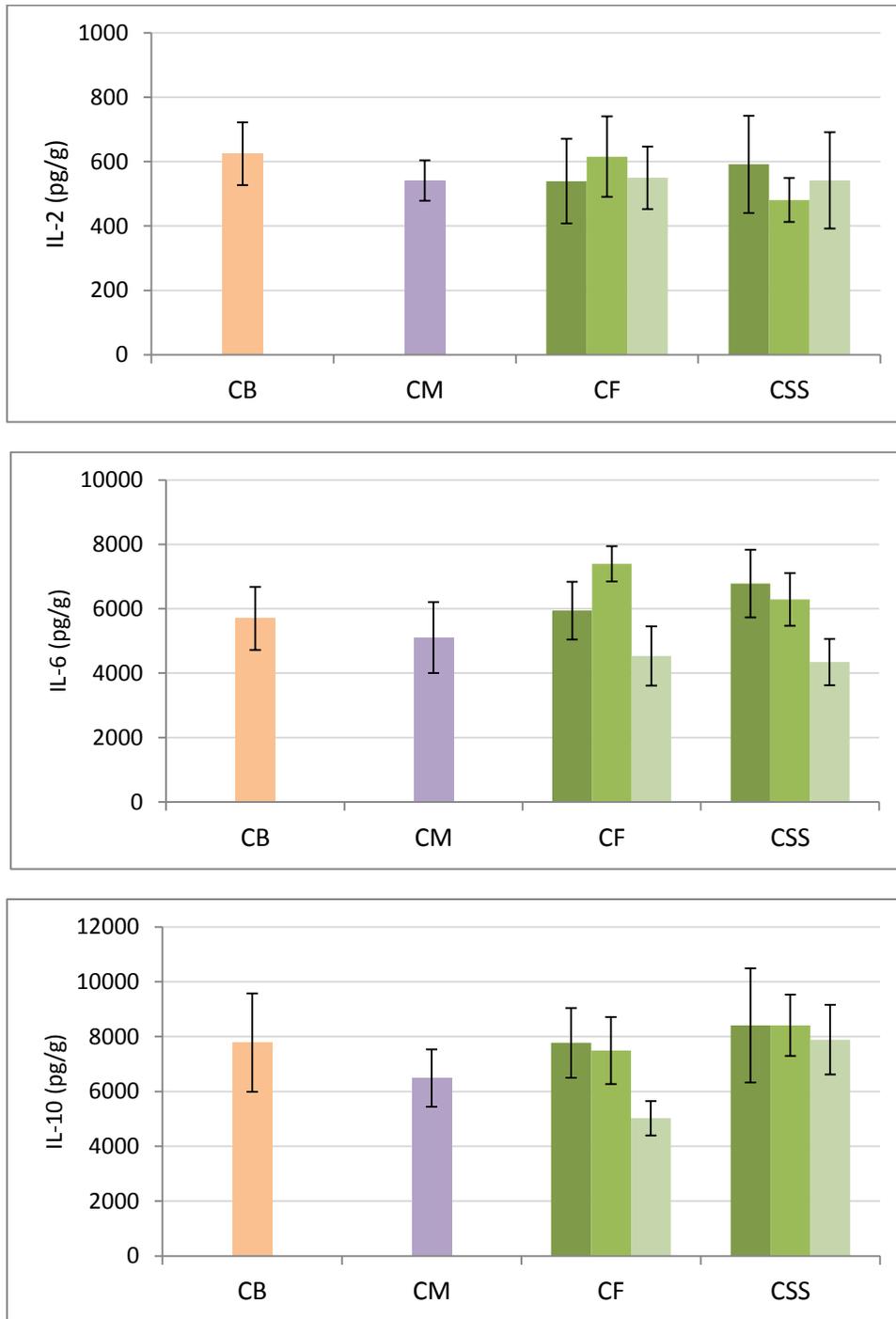


Figura 27: Efecto de la administración oral a ratones BALB/c de *L. rhamnosus* 64, durante 3 (■), 6 (■) y 10 días (■), como cultivo fresco (CF) o secado spray (CSS), sobre la expresión de citoquinas (ELISA) en homogenatos de intestino delgado, respecto a animales control de bioterio (CB) o animales control que recibieron solamente la matriz de secado (CM). Valores promedio \pm SEM.

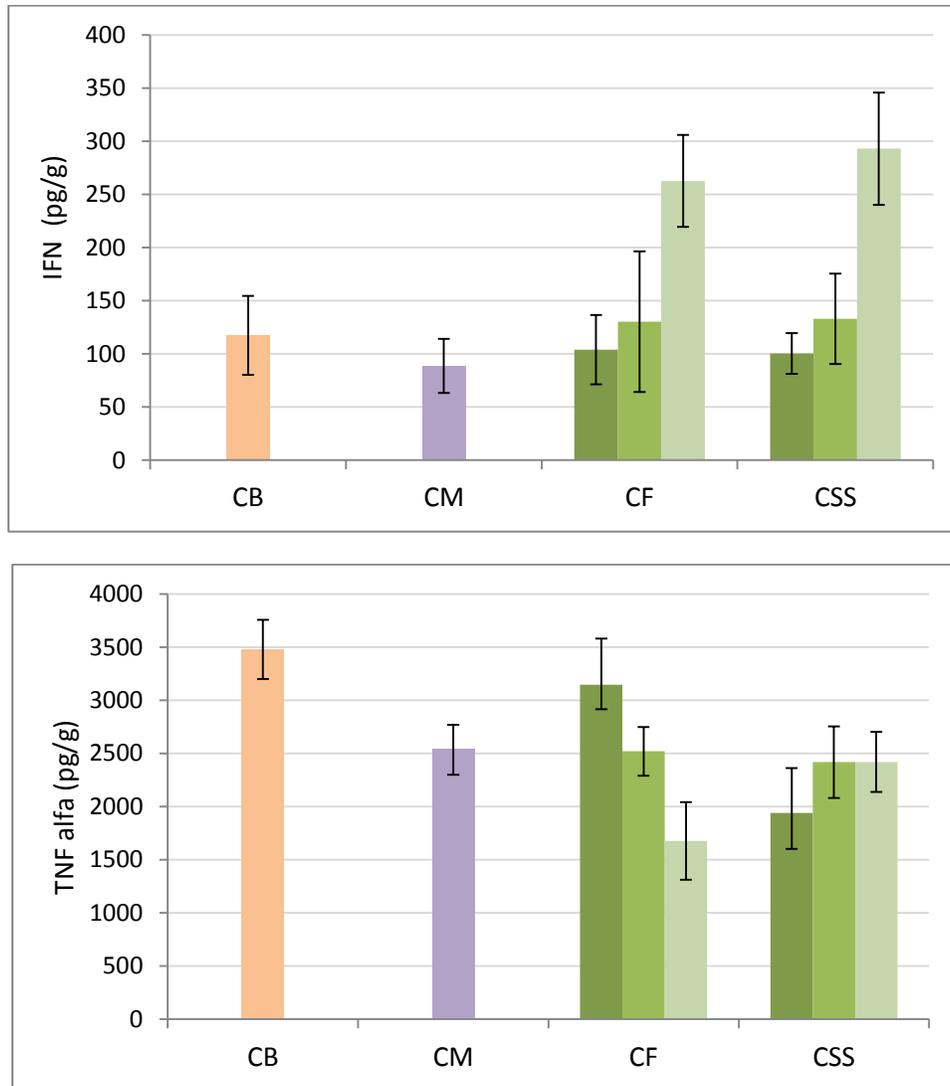


Figura 27: Efecto de la administración oral a ratones BALB/c de *L. rhamnosus* 64, durante 3 (■), 6 (■) y 10 días (■), como cultivo fresco o secado spray (reconstituido), sobre la expresión de citoquinas (ELISA) en homogenatos de intestino delgado. Valores promedio \pm SEM (continuación).

En intestino grueso, no se observaron diferencias significativas para IL-2 e IL-6 cuando se administró el cultivo fresco o secado spray. La expresión de IL-10 fue significativamente mayor a los 3 ($p = 0,043$), 6 ($p = 0,017$) y 10 días ($0,031$) de administración de la cepa como cultivo fresco y como cultivo secado spray el aumento significativo de esta citoquina reguladora se observó a los 3 días ($p = 0,049$) de administración (Fig. 28). IL-10 es una de

las citoquinas más frecuentemente analizadas cuando se estudia el perfil inmunomodulador de una cepa probiótica, ya que si bien muchas veces se la considera anti-inflamatoria (de Kivit y col., 2014), en realidad se trata de una citoquina reguladora que puede ser producida por distintas células inmunológicas como las células Treg y conducir, no a una respuesta inmune humoral o celular, sino también al desarrollo de tolerancia oral (Johansson y col., 2012, Rescigno y col., 2013). El aumento de su expresión se relaciona positivamente con el potencial de controlar o moderar procesos inflamatorios intestinales *in vivo* como la inflamación intestinal o diversos tipos de diarrea (Foligné y col., 2007; Paul y col., 2012). El aumento de IL-10 también fue reportado por Castillo y col. (2011) luego de alimentar ratones durante 7 días con *L. casei* CRL 431. El tratamiento activo con probióticos induce cambios en la respuesta inmune de personas con enfermedad inflamatoria intestinal, caracterizada por una disminución en el número de monocitos y células dendríticas productoras de IFN- γ y un aumento de la secreción de IL-10 y TGF β (Pathmakanthan y col., 2004). Una revisión de resultados de ensayos en humanos mediante meta-análisis concluyó que el tratamiento con probióticos puede ser efectivo para pacientes con trastornos inflamatorios como colitis ulcerosa durante el periodo de remisión (Sang y col., 2010).

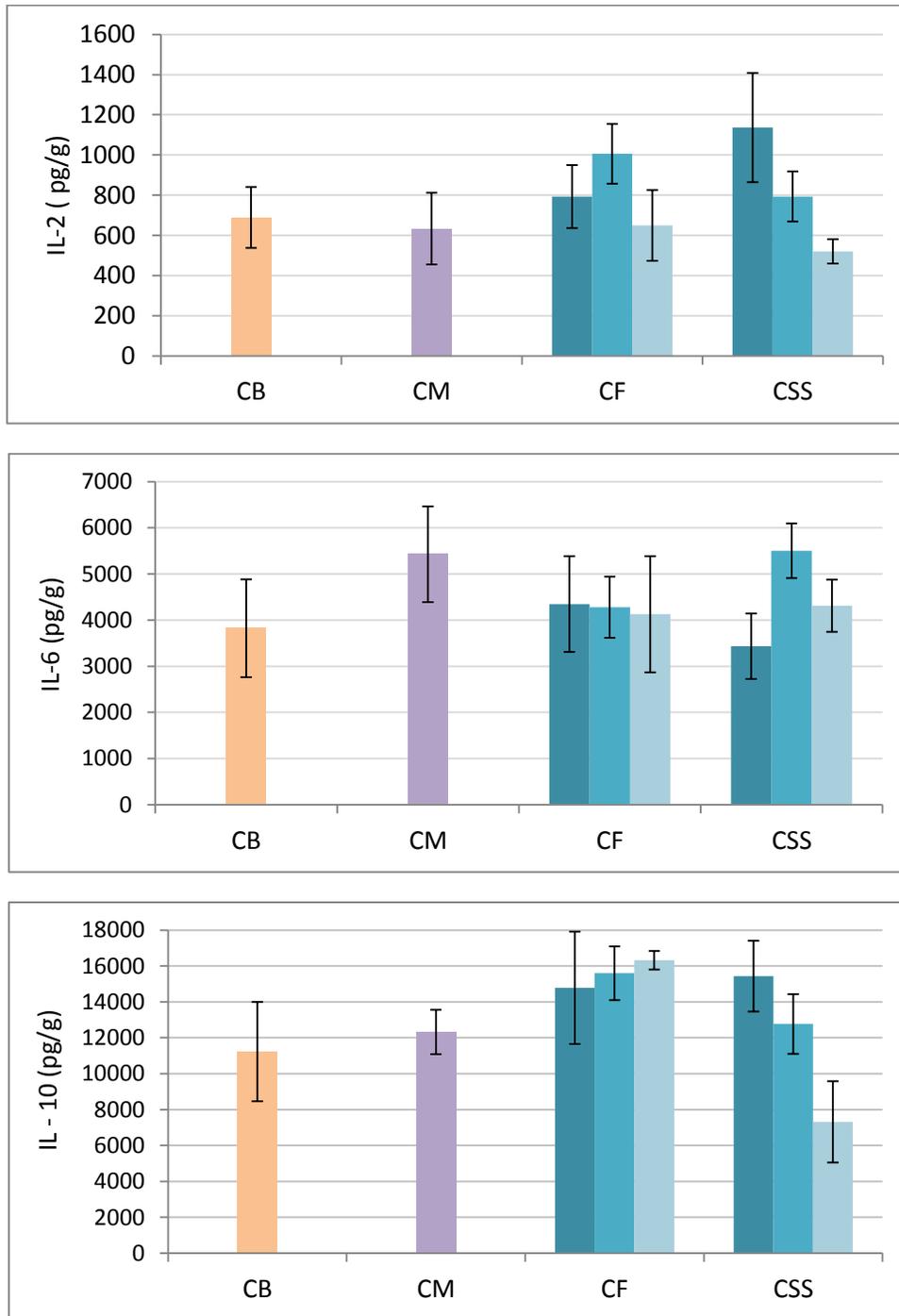


Figura 28: Efecto de la administración oral a ratones BALB/c de *L. rhamnosus* 64, durante 3 (■), 6 (■) y 10 días (■), como cultivo fresco o secado spray (reconstituido), sobre la expresión de citoquinas (ELISA) en homogenatos de intestino grueso respecto a animales control de biotério (CB) o animales control que recibieron solamente la matriz de secado (CM). Valores promedio \pm SEM.

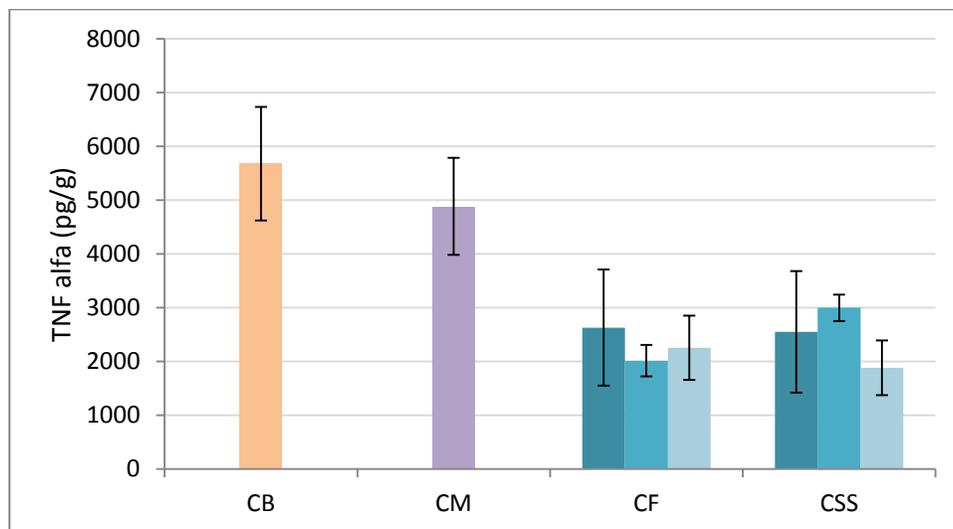
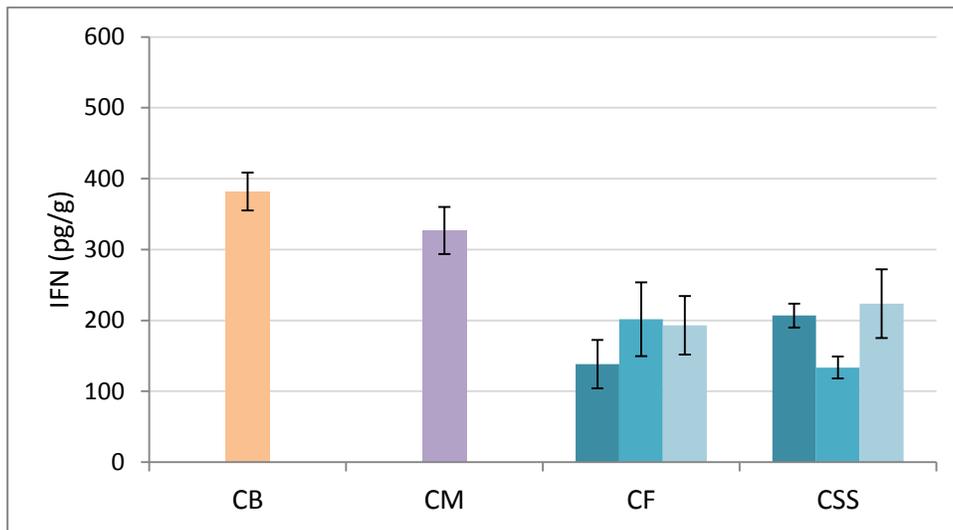


Figura 28: Efecto de la administración oral a ratones BALB/c de *L. rhamnosus* 64, durante 3 (■), 6 (■) y 10 días (■), como cultivo fresco (CF) o secado spray (CSS), sobre la expresión de citoquinas (ELISA) en homogenatos de intestino grueso, respecto a animales control de biotério (CB) o animales control que recibieron solamente la matriz de secado (CM). Valores promedio \pm SEM (continuación).

En relación a la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ y TNF- α , se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) para la cepa administrada como cultivo fresco o secado spray para todos los días de administración, sin diferencias entre tratamientos o entre períodos de administración (Fig. 28). Esta disminución de la respuesta inflamatoria podría ser de utilidad en un cuadro de infección intestinal por patógenos alimentarios como *Salmonella enterica* serovar. Typhimurium, la cual induce una fuerte respuesta inflamatoria a nivel intestinal (Watson y Holden, 2010). El rol del IFN- γ en la respuesta inmune desencadenada contra *Salmonella* Typhimurium es complejo, debido a que su participación es también fundamental en los primeros momentos posteriores a la infección para activar a los macrófagos y desencadenar la respuesta inflamatoria (Lapaque y col., 2009).

Para evaluar el impacto de los procesos de deshidratación sobre las características de los cultivos probióticos, la supervivencia bacteriana ha sido el parámetro clásico para determinar la resistencia al proceso luego de la rehidratación. Sin embargo, los estudios sobre el impacto de los procesos de secado sobre la viabilidad de los microorganismos a menudo no tienen en cuenta aspectos relacionados a la funcionalidad, más allá de la viabilidad celular. De hecho, la simple supervivencia de las bacterias probióticas al proceso de deshidratación no necesariamente se correlaciona directamente con la preservación de sus efectos beneficiosos. Estudios previos han mostrado que la misma cepa probiótica, producida y/o preservada bajo diferentes condiciones de almacenamiento, puede presentar diferentes respuestas en relación a su susceptibilidad a las condiciones adversas del TGI, su capacidad de adherirse al epitelio intestinal o su capacidad inmunoestimuladora, modificándose su funcionalidad aunque se mantenga su viabilidad (Saarela y col., 2009; Vinderola y col., 2012). Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo se alinean con lo publicado por varios autores que evaluaron la funcionalidad en un modelo *in vitro* y/o *in vivo*, donde el efecto del proceso de deshidratación modificó la funcionalidad de estos cultivos en alguno de los parámetros medidos (Makinen y col., 2012; Paez y col., 2013; Iaconelli y col., 2015). Por lo que, la realización de los estudios de funcionalidad en el formato tecnológico o en la matriz alimentaria utilizada como

vehículo, permitirán una estimación más apropiada de la funcionalidad del cultivo respecto a las observaciones que se puedan hacer empleando para los ensayos *in vivo* los cultivos obtenidos en condiciones de laboratorio.

CONCLUSIONES PARCIALES.

L. rhamnosus 64 posee la capacidad de estimular las defensas intestinales, mediadas por la IgA en un modelo animal, y en sitios distantes al intestino, como es la cavidad peritoneal, a través de la promoción de la actividad fagocítica de macrófagos residentes en este sitio anatómico. Por otro lado, el tratamiento tecnológico aplicado modificó la expresión de estos parámetros y de los perfiles de citoquinas. La promoción de la actividad de macrófagos y de IgA, junto a la modificación de los perfiles de citoquinas no constituyen en sí mismo un efecto benéfico de la administración de bacterias probióticas, sino tal vez un pre requisito para inducir algún efecto benéfico tangible. En este sentido, es conveniente, una vez observadas estas propiedades, la aplicación de modelos murinos de patologías intestinales para poner en evidencia la verdadera capacidad probiótica de la cepa en estudio, más allá de sus propiedades inmunomoduladoras básicas. Por otro lado, *a priori*, y sin haber relacionado las modificaciones de las propiedades inmunomoduladoras de la cepa con alguna patología intestinal en concreto, no es posible predecir si estas modificaciones por tratamientos tecnológicos son positivas o no para la funcionalidad de la cepa, aspectos que serán abordados en los próximos dos apartados.

CAPITULO III-b: Estudio de la capacidad de protección de *L. rhamnosus* 64 en un modelo de salmonelosis.

1. INTRODUCCIÓN.

El género *Salmonella* forma parte de la familia Enterobacteriaceae y está integrado por bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Poseen las características generales de las enterobacterias: son microorganismos fermentadores de glucosa, catalasa positivos, oxidasa negativos y suelen ser móviles (de Jong y col., 2012).

La infección con *Salmonella* generalmente se origina por el consumo de alimentos contaminados. Una vez ingerida, la bacteria se propaga rápidamente a lo largo del tracto gastrointestinal y penetra la mucosa a través de tres rutas: (i) invasión preferencial de las células M (células epiteliales especializadas) ubicadas en los domos de las placas de Peyer, (ii) invasión activa de enterocitos, y (iii) a través de las células dendríticas que extienden sus dendritas a través de las células epiteliales hacia el lumen intestinal (Pontier-Bres y col., 2014). *Salmonella enterica* puede invadir un gran espectro de hospedadores causando tanto infecciones agudas como crónicas a través de su habilidad de replicarse y persistir tanto dentro de las células epiteliales (no fagocíticas) como dentro de células fagocíticas (células dendríticas, neutrófilos y macrófagos) del sistema inmune innato del hospedador. Una característica común de la salmonelosis es una marcada respuesta inflamatoria desencadenada por el sistema inmune innato del hospedador (Hurley y col., 2014).

Mientras algunos serotipos son capaces de producir enfermedades con diversas características en distintas especies hospedadoras, otros serotipos sí son específicos, como *S. enterica* serovar Typhi en el caso del hombre. La infección con *Salmonella* o la enfermedad asociada con ella, salmonelosis, es a menudo caracterizada por una enteritis. En ratones, por ejemplo, la respuesta a una infección con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium usualmente está marcada por una infiltración moderada de la mucosa intestinal y una marcada infección sistémica asociada con lesiones en hígado y bazo por su traslocación a estos órganos (Santos, 2014).

Una característica observada de la respuesta inmune contra *Salmonella* es la producción de IFN- γ por parte de las células natural killer (NK) en los primeros estadíos de la infección, y por parte de células Th1 y Th2 en etapas posteriores (Spees y col., 2014).

Además, los macrófagos activados también producen citoquinas como IL-18 e IL-12, las cuales desencadenan la producción dependiente de IFN- γ de células Th1 específicas (Patel y Mc Cormick, 2014). También se ha descrito el efecto de la IgA secretoria en la infección con *Salmonella*, neutralizando al patógeno (Patel y Mc Cormick, 2014).

Se han establecido modelos murinos de salmonelosis para estudiar la patogénesis de la fiebre tifoidea, utilizándose distintas cepas de una especie estrechamente relacionada, *S. enterica* serovar Typhimurium (Watson y Holden, 2010). El modelo murino es ampliamente utilizado no sólo para estudiar los mecanismos de la patogénesis (Mastroeni y Sheppard, 2004), sino también para estudiar la capacidad de bacterias probióticas en la prevención o tratamiento de infecciones entéricas causadas por *Salmonella* (Gill y col., 2001; Truusalu y col., 2008; Castillo y col., 2011; Zacarias y col., 2014). El amplio rango de virulencia entre distintas cepas de *S. enterica* presentes en la naturaleza (Heithoff y col., 2012) explicaría el amplio rango de dosis infectivas reportadas en ratones (10^5 a 10^{10} UFC/ratón) (Suitso y col., 2010). La infección también depende de la sensibilidad de la cepa de ratón utilizada.

Para estudiar los efectos de un cultivo probiótico sobre la prevención de infección por *Salmonella*, es posible utilizar un modelo de sobrevida o uno de traslocación, como ha sido abordado en un trabajo de nuestro grupo (Zacarias y col., 2014). En el modelo de sobrevida, se monitorea la supervivencia a una infección con *Salmonella* en animales que recibieron previamente el cultivo probiótico en estudio, respecto a animales control, solamente infectados con el patógeno. Este es un modelo operativamente sencillo, pero del cual se obtiene relativamente poca información (% de sobrevida) y no se puede obtener evidencia de la magnitud de la infección/protección ni sobre los mecanismos involucrados en la protección contra la infección. El modelo de traslocación es más complejo, laborioso y honeroso. En este modelo los animales se sacrifican a los 4-5 días post-infección con el patógeno (luego de haber recibido por vía oral el probiótico en estudio), y permite cuantificar los niveles del patógeno en los órganos internos (traslocación a hígado, bazo, sangre, nódulos linfoides mesentéricos), además de cuantificar en diferentes tejidos (fluido intestinal, sangre, homogenatos de intestino), los

niveles de IgA y citoquinas, de modo de comprender y caracterizar el proceso de infección (en animales control) y de protección (en animales tratados) contra el patógeno. Una aproximación razonable es aplicar en primer lugar el modelo de sobrevivencia (menos complejo, más rápido y económico) y, si se observan resultados alentadores, repetir el estudio aplicando el modelo de traslocación (más complejo, pero que provee más información). Considerando que la capacidad de aumentar la IgA en la mucosa intestinal luego de la administración oral de bacterias lácticas ha sido relacionada con la protección frente a una infección con *Salmonella* (Vinderola y col., 2007), resultado que se observó en el capítulo anterior mediante ELISA (IgA-S) e inmunohistoquímica (células IgA+).

OBJETIVO.

El objetivo de este capítulo fue determinar la capacidad de protección de *L. rhamnosus* 64 contra una infección entérica por *Salmonella*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Microorganismos.

Se utilizó *L. rhamnosus* 64 como cultivo secado spray en suero de queso - almidón 20% (p/v). Las condiciones de secado utilizadas fueron T° entrada: 140°C, T° salida: 80°C, Caudal de alimentación: 6mL/min (mini secadero spray Büchi). El cultivo secado spray en suero de queso - almidón 20% (p/v) se reconstituyó al 20% (pv) en PBS, con incubación a 37°C durante 15 min y agitación periódica en vortex para rehidratación y disolución total.

Para el desafío con el patógeno en ratones se utilizó *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium Malbrán. Se obtuvieron cultivos *overnight* del patógeno en caldo Infusión Cerebro Corazón (Britania, Buenos Aires, Argentina) incubados 18 h a 37°C en condiciones de aerobiosis.

2.2. Animales y alimentación.

Se utilizaron 30 ratones machos BALB/c de 6 semanas de edad (20 ± 1 g) provenientes de la colonia cerrada del Centro de medicina comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (IciVet – Litoral) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe). Los animales se alojaron en el bioterio del INLAIN (UNL-CONICET) en cajas de plástico transparentes en grupos de 5 animales/jaula y se mantuvieron a 21 ± 1 °C, con una humedad de $55 \pm 2\%$, y ciclo luz/oscuridad de 12h. Los animales recibieron *ad libitum* alimento balanceado convencional (Cooperación, Buenos Aires, Argentina) y agua de red y se aclimataron por un período de 7 días previos al ensayo. Los animales fueron tratados según la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Experimentación del National Institute of Health (NIH, USA) y los ensayos fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL (Esperanza, Santa Fe, Argentina).

Los ratones (15 animales/grupo) recibieron durante 10 días consecutivos 10^8 UFC/día/animal del cultivo secado spray. El grupo control se intubó diariamente y durante 10 días con suero de queso + almidón 20% (p/v). Debido a que el bioterio del IciVet puede asegurar la provisión de hasta 30 animales de peso y edad homogéneos por partida, y para no disminuir la potencia estadística del ensayo al reducir el tamaño de la muestra de cada grupo, se decidió establecer un grupo control y un grupo tratado con la cepa secada spray, a expensas del grupo con la cepa como cultivo fresco, ya que el interés principal de este primer ensayo exploratorio era determinar la capacidad de la cepa, en el formato tecnológico secado spray, de prevenir una infección intestinal por *Salmonella*. Al día 11, los animales fueron desafiados con una única dosis infectiva de 10^6 UFC/ml de *Salmonella* Typhimurium Malbrán, por intubación intragástrica. Se determinó diariamente el peso de los animales post-infección y se monitoreó diariamente la sobrevida a la infección, los resultados se expresaron como porcentaje de sobrevida.

2.3. Análisis estadístico.

Los datos (% de sobrevivida) de los ensayos de mortalidad fueron evaluados por el test Log Rank.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

No se observaron diferencias significativas en la sobrevivida a la infección entre el grupo control y el grupo que recibió *L. rhamnosus* 64 como cultivo secado spray (Fig. 29). En general, en estos modelos de infección se utiliza una dosis infectiva moderada que permita una sobrevivida del grupo de control de infección del 20-40% (Vinderola y col., 2007; de Moreno de Leblanc y col., 2010), Sin embargo, en este ensayo se observó una baja sobrevivida del grupo control respecto a otros estudios, lo cual podría sugerir que la dosis infectiva fue tal vez demasiado alta como para permitir que el probiótico contribuya a resolver la infección. Zacarias y col., (2014) reportaron variabilidad de la sobrevivida ante una misma dosis infectiva de *Salmonella*. En el estudio de referencia, la misma dosis infectiva de la misma cepa de *Salmonella* (10^6 UFC/ratón) indujo diferentes porcentajes de sobrevivida a la infección en los animales control (50%, 40% ó 0%, en los ensayos de mortalidad).

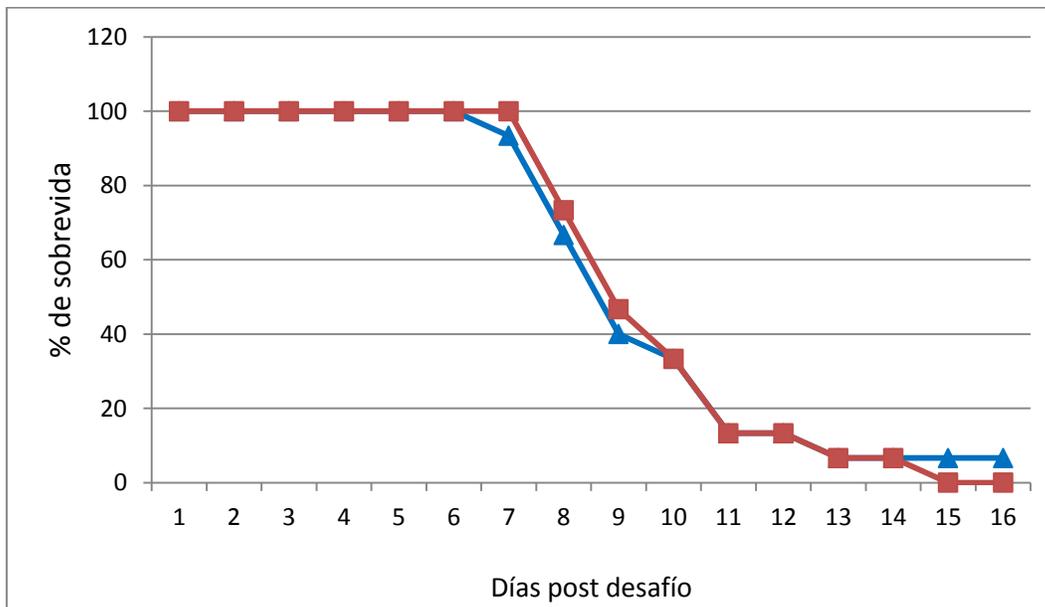


Figura 29: Sobrevida (%) de ratones control (▲) y de animales que recibieron durante 10 días un cultivo de *L. rhamnosus* 64 secado spray (■), a una infección con *Salmonella* Typhimurium Malbrán.

El rango de dosis infectiva para las distintas cepas de *Salmonella* ser. Typhimurium puede ser muy amplio y variable dependiendo del modelo animal utilizado (Suitso y col., 2010; Zacarias y col., 2014). Si bien las razones de esta variabilidad en los modelos aplicados no se conoce, podría deberse al hecho de que el proceso infectivo de *Salmonella* en ratones es considerado un proceso dinámico y heterogéneo y dependiente de múltiples variables que afectan al hospedador (Watson y Holden, 2010). Incluso Bellet y col. (2013) han descrito la influencia de los ritmos circadianos en la respuesta inmune frente a la infección con *Salmonella*, debido a la expresión diferencial de genes con los ciclos de luz y oscuridad. Además, no se puede descartar cierta variabilidad debido a la posible contaminación cruzada con *Salmonella* debido a la coprofagia en los ratones albergados en la misma jaula luego de la infección. Esta variabilidad en la sobrevivencia fue también observada en ratones libres de gérmenes y convencionales en este modelo de infección (Silva y col., 1999; Maia y col., 2001; Lima-Filho y col., 2004; Silva y col., 2004; Martins y col., 2005; Martins y col., 2007; Martins y col., 2009; Martins y col., 2010).

Al no haberse observado diferencias en los porcentajes de sobrevivencia ni en la velocidad de muerte entre el grupo control y tratado, se decidió no profundizar en este modelo.

4. CONCLUSIONES PARCIALES.

En este ensayo de salmonelosis no se observó efecto de *L. rhamnosus* 64 como cultivo seco spray sobre la prevención de la mortalidad respecto a animales control, este resultado podría atribuirse a un elevado nivel de infección, considerando la baja sobrevivencia del grupo control, respecto a otros trabajos donde se logró una sobrevivencia de aproximadamente el 30% o a una falta de capacidad protectora intrínseca de la cepa.

CAPITULO III-c: Estudio de la capacidad de protección de *L. rhamnosus* 64 en un modelo de inflamación intestinal de colitis aguda.

1. INTRODUCCIÓN.

El tracto gastrointestinal humano es un ecosistema complejo en donde coexisten bacterias residentes y de tránsito. Esta microbiota cumple importantes funciones fisiológicas y metabólicas incluyendo el mantenimiento del sistema inmune asociado al intestino (Purchiaroni y col., 2013). El desequilibrio de la microbiota intestinal conduce a un deterioro de la función inmunológica del intestino y puede derivar en enfermedades gastrointestinales crónicas, entre ellas la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Duboc y col., 2013). Existen estudios referidos a la utilización de probióticos como tratamiento adyuvante de numerosas enfermedades que afectan el tracto gastrointestinal, como diarrea, EII, cáncer, infección con *Helicobacter pylori*, alergias e intolerancia a la lactosa (Hill y col., 2014; McFarland, 2014; Narbona López y col., 2014; Chávez-Tapiay col., 2015).

Las propiedades de los probióticos para aliviar los síntomas de la EII implican la capacidad de restaurar la diversidad de la microbiota, el antagonismo contra los patógenos, la mejora de la producción de moco, la estimulación de la proliferación epitelial, la modulación de la permeabilidad intestinal y la mediación de los efectos pro-inflamatorios (Scaldaferri y col., 2013; Chávez-Tapiay col., 2015).

En la actualidad se utilizan distintos modelos de colitis para evaluar la actividad anti-inflamatoria de potenciales probióticos, principalmente de aquellas cepas capaces de inducir de IL-10 en cultivos celulares o en estudios de inmunomodulación *in vivo* (Foligne y col., 2007). En muchos casos, se cuantifica la reducción de la inflamación inducida químicamente por TNBS (trinitrobenzene sulfonic acid) o DSS (dextran sulfate sodium) (Claes y col., 2011; Foligné y col., 2015). Estos modelos son en su mayoría modelos agudos, mientras que los modelos de inflamación crónica son menos comunes y se basan en dosis menores de estas sustancias, repartidas en un período de tiempo. Cada modelo tiene su propia especificidad y algunas intervenciones pueden tener efectos opuestos en diferentes modelos. Mientras que el TNBS provoca un proceso inflamatorio que recluta células T, en el modelo con DSS se inducen principalmente alteraciones en la barrera epitelial (Foligne y col., 2010a).

El TNBS es un compuesto altamente reactivo que en contacto con la mucosa intestinal provoca lesiones necróticas y transmurales. Se ha sugerido que la capacidad lesiva del TNBS es debida a los metabolitos reactivos de Oxígeno que se producen en el intestino por la acción de macrófagos y neutrófilos activados por la gran variedad de estímulos procedentes del lumen intestinal. Las lesiones intestinales obtenidas mediante este procedimiento experimental evolucionan hacia una fase más crónica de inflamación con un prominente infiltrado de células mononucleares y presencia ocasional de granulomas. Es frecuente observar úlceras, engrosamiento de la pared intestinal y reducción de la longitud del colon en los animales tratados con TNBS (Morris y col., 1996). Teniendo en cuenta que los modelos inflamatorios de colitis inducida TNBS afectan al colon y que en los estudios de inmunomodulación se observó un aumento significativo de la síntesis de IL-10 en intestino grueso por parte de la cepa en estudio.

OBJETIVO.

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de la administración oral de *L. rhamnosus* 64 como cultivo fresco y secado spray, frente a un modelo de colitis aguda inducida químicamente por TNBS.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Microorganismo.

Se utilizó *L. rhamnosus* 64, administrada oralmente, como cultivo fresco y secado spray (reconstituído). La suspensión celular del cultivo fresco se preparó diariamente a partir de un cultivo *overnight* (18h, 37°C, aerobiosis) de la cepa, el cual se lavó con solución PBS (6000 rpm, 15 min, 8°C), y se resuspendió en suero de queso - almidón (20% p/v). Para la administración del cultivo deshidratado, se reconstituyó de la misma manera que en el Capítulo IIIb.

2.2. Animales y alimentación.

Se utilizaron 30 ratones machos BALB/c de 6 semanas de edad (20 ± 1 g) provenientes de la colonia cerrada del Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (IciVet – Litoral) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe). Los animales se alojaron en el bioterio del INLAIN (UNL-CONICET) en cajas de plástico transparentes en grupos de 5 animales/jaula y se mantuvieron a 21 ± 1 °C, con una humedad de $55 \pm 2\%$, y ciclo luz/oscuridad de 12h. Los animales recibieron *ad libitum* alimento balanceado convencional (Cooperación, Buenos Aires, Argentina) y agua de red y se aclimataron por un período de 7 días previos al ensayo. Los animales fueron tratados según la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Experimentación del National Institute of Health (NIH, USA) y los ensayos fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Se administró la cepa *L. rhamnosus* 64 por intubación intragástrica (2×10^8 UFC/día/animal) durante 5 días previos a la administración de TNBS. Durante el estudio se registró el peso corporal de los animales.

2.3. Inducción de colitis aguda por TNBS.

Se utilizó un modelo murino estandarizado (Foligné y col., 2006), donde se indujeron niveles moderados de inflamación en ratones anestesiados intraperitonealmente con un cocktail (0,2 mL/animal) de ketamina/xilacina/acepromacina. Se administró TNBS (Sigma) en una dosis de 100 mg/kg de peso corporal disuelta en una solución de 0,9% de NaCl/ etanol (50/50, v/v) en un volumen de 50 μ L de la solución por animal por vía rectal.

2.3.1 EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LA COLITIS.

Tres días después de la inducción de colitis los animales fueron pesados, anestesiados intraperitonealmente con un cocktail (0,2 mL/animal) de

ketamina/xilacina/acepromacina y sacrificados por dislocación cervical. Se retiró el colon, se eliminaron restos de grasa y tejido mesentérico, se abrió cuidadosamente de forma longitudinal y se realizó un lavado del interior del colon con PBS para la remoción de restos de materia fecal. El colon se midió y se evaluó el daño y la inflamación según los criterios de Wallace (Wallace y col., 1989). Este criterio califica macroscópicamente (Fig. 30) (puntuaciones que van de 0 a 10) y refleja (i) la intensidad de la inflamación, (ii) el engrosamiento de la mucosa colónica, y (iii) el grado de ulceración (Foligné y col., 2006).



Figura 30: Evaluación del daño e inflamación del colon según score de Wallace.

2.4. Tratamiento estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Las comparaciones entre los grupos de estudio fueron determinados con las pruebas de Mann-Whitney los resultados se representaron como medianas (IC). El criterio de significación estadística que se adoptó fue $p < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En modelos *in vivo*, diferentes cepas probióticas han demostrado la capacidad de promover las defensas inmunológicas en animales sanos (Diaz-Ropero y col., 2006), potenciando parámetros pertenecientes tanto a la inmunidad natural como adquirida. Estas observaciones podrían explicar el papel protector de estas cepas en el modelo animal de infección por *Salmonella* (Olivares y col., 2006), o de reducir la respuesta inflamatoria observada en modelos de enfermedad inflamatoria intestinal en ratones (Peran y col., 2007). A pesar de ello, la eficacia o la potencia de cada probiótico es una característica específica de cada cepa en particular y, por ello, no es posible generalizarla a otras cepas de la misma especie.

En este capítulo se evaluó el efecto de la administración oral de *L. rhamnosus* 64 durante 5 días en un modelo de colitis aguda inducida químicamente (TNBS) en ratones BALB/c. Tras el sacrificio de los animales, tres días después de la administración de TNBS, se realizó un examen macroscópico del grado de inflamación según el *score* de Wallace (Wallace y col., 1989).

La evaluación macroscópica de los tejidos permitió observar que en el grupo de animales control tuvo lugar un engrosamiento de la pared del intestino grueso, al igual que en el grupo que recibió el cultivo fresco de *L. rhamnosus* 64. El tejido colónico mostró mayores zonas de ulceración y necrosis respecto al grupo de animales que recibió el cultivo de *L. rhamnosus* 64 secado spray. Los animales tratados con el cultivo secado spray presentaron un grado de inflamación menor que los tratados con el cultivo fresco ($p=0,0018$) y que los del grupo control ($p=0,043$) (Fig.31). La administración del cultivo secado spray produjo un efecto también en la longitud del colon. El acortamiento de colon fue significativamente mayor en los ratones del grupo control respecto al grupo que recibió el cultivo secado spray ($p=0,044$) (Fig. 32). Foligne y col., (2015) observaron que administrando una combinación de cepas probióticas en un modelo de colitis inducida por DSS, se observó una tendencia pero sin reducción significativa de algunos de los marcadores inflamatorios como la longitud del colon.

En cuanto al peso de los animales luego de la administración de TNBS, no se observaron diferencias significativas entre los grupos evaluados (Fig. 33), coincidiendo con lo publicado por Preising y col., 2010. Según Philippe y col. (2011) los animales tratados con *B. bifidum* S17 mostraron una tendencia hacia la inhibición parcial de la pérdida de peso inducida por TNBS, aunque este efecto no alcanzó a ser significativo, probablemente porque en el modelo de colitis aguda el período entre la administración y el sacrificio es corto.

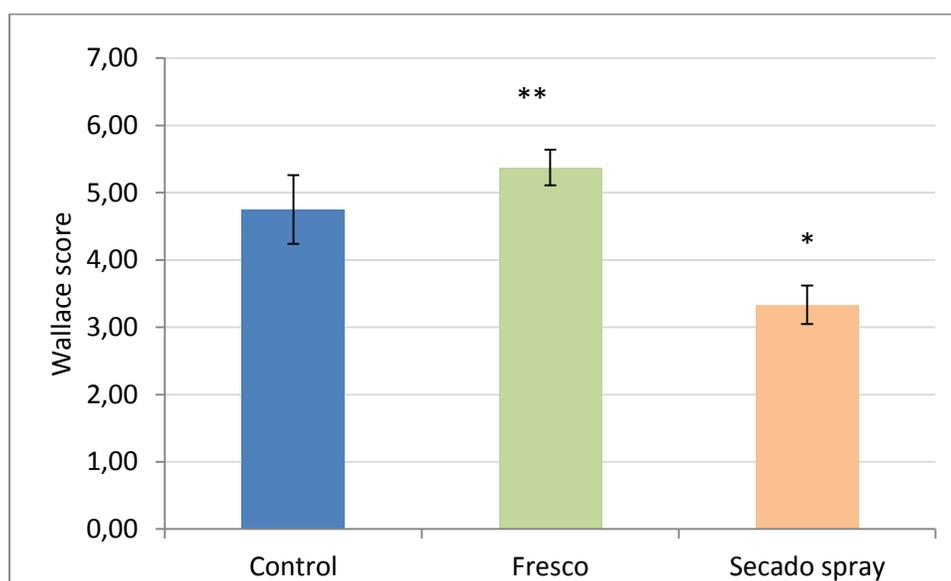


Figura 31: Score macroscópico (Wallace) luego de la administración de *L. rhamnosus* 64, como cultivo fresco o secado spray en un modelo de colitis (TNBS) en ratones. *Diferencia significativa respecto al control ** Diferencia significativa entre los cultivos fresco y secado spray.

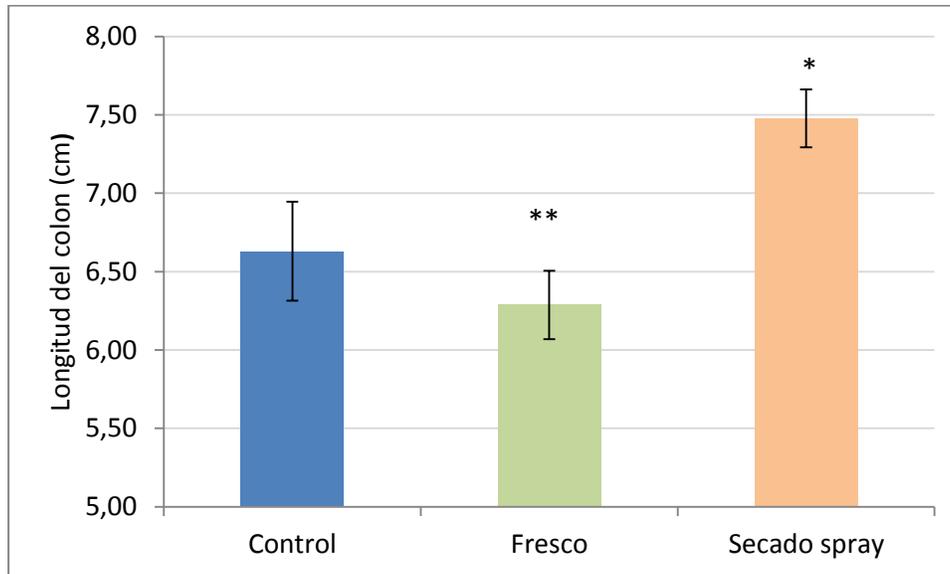


Figura 32: Longitud del colon (cm) luego de la administración de *L. rhamnosus* 64 fresco o secado spray en un modelo de colitis (TNBS) en ratones. *Diferencia significativa respecto al control ** Diferencia significativa entre cultivo fresco y secado spray.

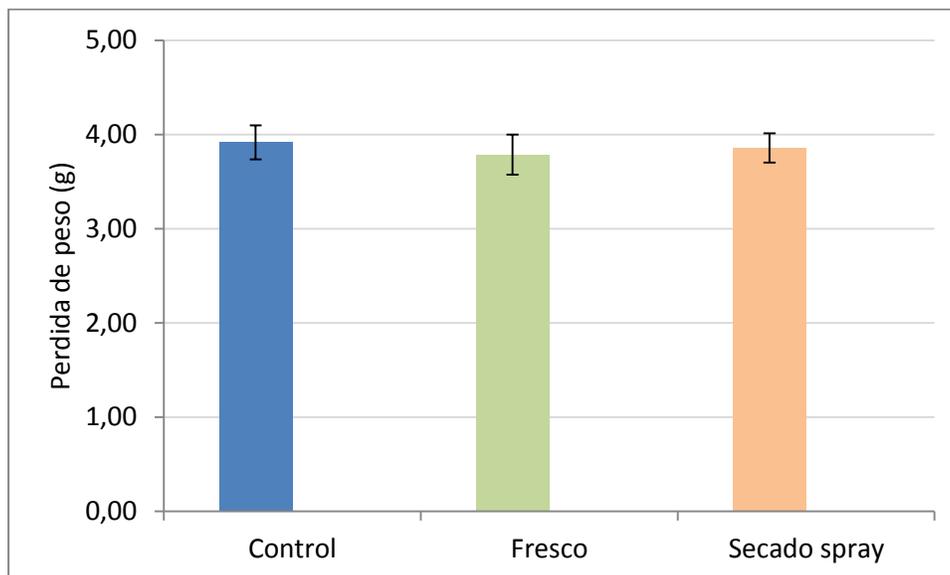


Figura 33: Pérdida de peso en animales control y en aquellos que recibieron *L. rhamnosus* 64, como cultivo fresco y secado spray, luego de 3 días de la administración intrarectal de TNBS.

Si bien estos estudios son preliminares y deberían profundizarse evaluando índices microscópicos de inflamación (test de Ameho) y la expresión de citoquinas inflamatorias y reguladoras en tejido colónico, es posible observar que la administración oral de *L. rhamnosus* 64, como cultivo secado spray, produjo un efecto protector frente a la colitis inducida por TNBS. Un mecanismo, a verificar, que puede haber contribuido al aumento en la protección es la inducción de IL-10 en intestino grueso observada para la cepa en este trabajo de Tesis, la cual es una citoquina con efectos regulatorios y anti-inflamatorios (Paul y col., 2012). Una posibilidad que no debe desestimarse también es que, al ajustar la dosis administrada de *L. rhamnosus* 64 según la cantidad de bacterias viables, y al tener el cultivo secado spray una cierta fracción de células inactivadas por calor inherente al proceso de secado spray, los animales que recibieron el cultivo deshidratado hayan recibido una dosis mayor de células totales (viables y no viables), que aquellos animales del grupo que recibieron el cultivo fresco. Numerosos reportes indican que si bien la viabilidad es una condición para que un cultivo sea considerado probiótico, las células no viables también contribuyen parcialmente al efecto probiótico (Ouwehand y Salminen 1998; Galdeano y Perdígón 2004; Lahtinen, 2012).

4. CONCLUSIONES PARCIALES.

Si bien los resultados son limitados y debería profundizarse el estudio ampliando la cuantificación a otros parámetros histológicos y químicos, se observó que la administración de *L. rhamnosus* 64, como cultivo secado spray, podría tener un papel moderador de procesos inflamatorios intestinales.

CAPÍTULO IV: Producción de *L. rhamnosus* 64 deshidratado por secado spray a escala piloto e industrial y aplicación tecnológica.

INTRODUCCIÓN.

Los alimentos adicionados de microorganismos probióticos, además de cumplir con la función de ser vehículo de los mismos, pueden contribuir a amortiguar su paso a través del tracto gastrointestinal por su capacidad buffer y pueden a la vez contener otros ingredientes funcionales como componentes bioactivos que podrían interactuar con los probióticos y modificar benéficamente su funcionalidad y eficacia (Ranadheera y col., 2010).

La microencapsulación es un concepto importante para el mantenimiento de la viabilidad celular durante la producción, almacenamiento y consumo de alimentos con microorganismos probióticos microencapsulados. La inclusión de probióticos microencapsulados en alimentos plantea todavía desafíos que tienen que ver con la correcta incorporación a la matriz, que no tengan lugar fenómenos de separación de fases, que la microcápsula no sea percibida por el consumidor al momento de ingerir el alimento y que el probiótico sea liberado al medio en el momento oportuno (De Prisco y Mauriello 2016).

Para mejorar la robustez tecnológica y el paso por el tracto gastrointestinal de los microorganismos probióticos se han aplicado diferentes estrategias, como una cuidadosa selección de aquellas cepas con mayor aptitud tecnológica, el uso de ingredientes protectores de la viabilidad, la adaptación a niveles subletales de un estrés físico o químico o la manipulación genética, entre otras (Gueimonde y Sanchez, 2012). En cuanto a la tecnología utilizada para preservar la funcionalidad de los microorganismos probióticos, la microencapsulación aparece como una opción muy favorable. En este sentido, la tecnología adoptada es de suma importancia, así como la selección de los materiales de encapsulación, ya que las propiedades morfológicas y funcionales de las cápsulas (tamaño, morfología, textura, porosidad, momento de la liberación, entre otras) influyen en el éxito de la protección y en la liberación oportuna de los probióticos. Los biopolímeros de calidad alimentaria como alginato, quitosano, pectina, almidón, carragenano y proteínas de leche son las matrices más investigadas y utilizadas para la encapsulación de células debido a su eficacia en la protección de los probióticos a varias

condiciones de estrés, como la acidez gástrica y las sales biliares (De Prisco y Mauriello 2016).

Si bien la industria láctea ha sido pionera en la introducción de probióticos en alimentos, principalmente leches fermentadas y queso (Sánchez y col., 2012), en la actualidad una amplia gama de productos alimenticios, incluyendo alimentos para lactantes, bebidas lácteas y productos no lácteos como cereales para desayuno, productos cárnicos, chocolate y jugos de frutas, han sido evaluados como posibles vehículos (Saarela y col., 2006; Burgain y col., 2011 Soukoulis y col., 2013, Barbosa y col., 2016). Muchos de estos productos no se han desarrollado de manera comercial, ya que algunas tecnologías de encapsulación utilizadas en el ámbito de la investigación, requieren de pasos y/o procesos específicos sofisticados que dificultan su escalado y aumentan el costo, resultando inviable en la industria de alimentos. En este sentido, el secado spray de microorganismos probióticos es una tecnología de microencapsulación sencilla y factible de ser aplicada a nivel industrial.

OBJETIVO.

El objetivo de este capítulo fue avanzar en el escalado del proceso de secado spray de *L. rhamnosus* 64 y evaluar el agregado de la cepa, secada spray, a miniquesos blandos reducidos en grasas.

CAPÍTULO IV-a: Secado spray piloto de *L. rhamnosus* 64.

1. INTRODUCCIÓN.

La deshidratación es una forma común de aumentar la estabilidad de ciertos alimentos durante el almacenamiento y facilitar su manipulación. En la actualidad, diferentes productos y subproductos lácteos deshidratados son ampliamente comercializados y presentan un interés particular en la industria alimentaria. La tecnología de secado por pulverización implica la transformación de concentrados lácteos en una gran cantidad de pequeñas gotas, que están expuestas a un flujo rápido de aire caliente y a medida que entran en la cámara de pulverización, el agua se evapora y las gotas se convierten en partículas de polvo (Nikolova y col., 2015). La superficie de las partículas obtenidas es una de las características más importantes, ya que interactúa directamente con el medio ambiente, principalmente el agua y el aire, durante las operaciones de almacenamiento y rehidratación del cultivo (Jones y col., 2013).

La utilización de bacterias probióticas en productos lácteos fermentados (leches fermentadas y quesos) plantea, entre otras cosas, la necesidad del mantenimiento de la viabilidad de las mismas hasta el consumo y un sistema muy organizado de almacenamiento y distribución que garantice la cadena de frío (Champagne y Gardner, 2005; Ross y col., 2005). Aunque el secado spray puede inducir estrés térmico en microorganismos térmicamente lábiles, en los últimos años, y debido principalmente a su bajo costo, se ha propuesto como una tecnología de potencial interés para la producción de cepas específicas de diferentes especies del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, como *starters* y cultivos probióticos adjuntos deshidratados (Burgain y col., 2011). Además de las diferentes estrategias de microencapsulación, el uso de agentes protectores para microencapsular probióticos es un área también ampliamente investigada (Champagne y col., 1991; Anal y Singh, 2007, Chavez y col., 2011, Anekella y Orsat 2014).

Las matrices de encapsulación incluyen una variedad de materiales como goma arábica, alginato, gelatina, maltodextrina, pectina, leche descremada en polvo, almidón y proteínas de suero (como WPC y WPI), entre otros (De Castro y col., 2012). Estas sustancias desempeñan un papel clave en el proceso de secado, ya que protegen a los microorganismos durante la deshidratación y pueden dar lugar a diversos tipos de

morfología de las partículas (Sadek y col., 2015), lo que está relacionado con la estabilidad del probiótico durante el almacenamiento y la liberación del mismo en el alimento o en el tracto intestinal.

En la práctica, muchas veces la selección de la matriz de encapsulación y condiciones de secado spray se realiza por procedimientos de prueba y error, esta forma de trabajo implica mayor tiempo, produce mayores costos y no asegura estar trabajando en las mejores condiciones (Muñoz-Celaya y col 2012). La metodología de superficie de respuesta permite conocer cómo influyen las principales variables del proceso de secado sobre la viabilidad de los probióticos o para hacer un análisis metódico sobre la efectividad de las diferentes matrices de secado (Behboudi-Jobbehdar y col., 2013; Anekella y Orsat, 2014; Shokri y col., 2015). A pesar de las numerosas publicaciones referidas a la deshidratación de bacterias probióticas, aún no se encuentra disponible una tecnología de secado que se adapte para la producción de cualquier probiótico deshidratado, y tampoco un material de encapsulación universal que asegure la viabilidad independientemente del microorganismo utilizado (Makinen y col., 2012).

OBJETIVO.

El objetivo de esta parte del trabajo fue evaluar el efecto de un tratamiento térmico previo sobre la sobrevida al secado spray y durante la conservación, incluyendo ahora en la optimización el nivel de células viables, y avanzar en el escalado piloto de la producción de cultivos deshidratados por secado spray de *L. rhamnosus* 64.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Microorganismo.

Se utilizó la cepa *L. rhamnosus* 64, la cual se reactivó a partir de stocks congelados (-70°C) en MRS - glicerol 18% (p/v), y se utilizó luego de tres sucesivos repiques. Los cultivos *overnight* (16 h, 37°C) de la cepa se obtuvieron en caldo MRS (Biokar, Beauvais, Francia).

2.2 Optimización de las condiciones de secado spray para obtener la mayor supervivencia de *L. rhamnosus* 64.

En este ensayo se trabajó con la metodología de superficie de respuesta que, como se observó en los Capítulos 1 y 2, permite, de forma más efectiva que si se hiciera prueba – error, analizar de una manera sistemática el efecto de las variables del proceso de secado spray (Krishnaiah y col., 2012), sobre la supervivencia del microorganismo.

La producción de biomasa de *L. rhamnosus* 64 se llevó a cabo en un fermentador de 2 L (Sartorius Biostat A plus) inoculado (1% v/v) con un cultivo *overnight* (16 h, 37°C) de la cepa. La fermentación se llevó a cabo en el medio de cultivo optimizado (Run 20), compuesto por permeado de suero de quesería reconstituido (9% p/v) (Arla Foods, Porteña, Córdoba, Argentina) suplementado con 2,5 g/L de extracto de levadura, 2,5 g/L de triptona y 5 mL/L de solución Mg-Mn (MgSO₄ 2% p/v y MnSO₄ 0,4% p/v). La fermentación se realizó bajo condiciones de anaerobiosis con flujo de CO₂ (0,2 L/min) y agitación 200 rpm, manteniéndose a pH 6 controlado por la adición automática de una solución estéril de Na₂CO₃ (211,96 g/L) - NaOH (160 g/L).

Se realizó la optimización de las condiciones de secado spray en un secadero spray Büchi B-290 (Flawil, Suiza) utilizando como matriz de secado suero de queso – almidón (20% p/v de sólidos totales, relación 1:1). En general las variables de proceso que influyen en las características del producto son: condiciones de atomización, tipo de flujo de aire (co-corriente vs. contra-corriente), temperatura de entrada, caudal de alimentación y el tiempo de contacto entre la partícula y aire caliente (Masters, 1991).

La sobrevida al secado spray se evaluó utilizando la fórmula:

$$\text{Sobrevida (\%)} = 100 \times N/N_0$$

Donde N_0 : representa el número de bacterias viables antes del secado (UFC/mL) y N : representa el número de bacterias viables post secado (UFC/mL) (Gardiner y col., 2000).

Para conocer el efecto de las variables del proceso sobre la supervivencia al secado spray de *L. rhamnosus* 64, se incorporó, respecto a lo hecho en Capítulos anteriores, una variable independiente adicional (además de temperatura de entrada y flujo de aire): el caudal de alimentación. La principal variable de respuesta evaluada fue la supervivencia de la cepa (además de la humedad y la temperatura de salida). Para optimizar este proceso se llevó a cabo un diseño central compuesto, las variables y los niveles analizados se pueden observar en la Tabla 13.

Tabla 13: Diseño central compuesto utilizado para optimizar la sobrevida al secado spray de *L. rhamnosus* 64 en una solución de suero de queso – almidón (20% p/v, relación 1:1) mediante la metodología de superficie de respuesta.

Variables Independientes	Niveles de las variables			
	Variable	1	0	-1
Flujo de aire (mm ¹)	X1	50	40	30
Caudal de alimentación (%) ²	X2	25	20	15
Temperatura de entrada (°C)	X3	130	120	110

¹mm de columna: 50 mm equivalen a 601 L/h; 40 mm a 473 L/h; y 30 mm a 357 L/h.

²Caudal de alimentación: 25% = 7,5 mL/min; 20% = 6 mL/min; 15% = 4,5 mL/min.

2.3 Efecto de la aplicación de un estrés térmico moderado en el fermentador y/o en la solución de secado sobre la viabilidad.

Según lo expuesto en el capítulo 2 de esta tesis y lo publicado por Teixeira y col.(1994) y por Gouesbet y col. (2002), la aplicación de un nivel moderado de calor puede

inducir resistencia a mayores temperaturas, de manera que permite a los microorganismos, después de un choque de calor no letal, tolerar un segundo estrés térmico de mayor intensidad. Se evaluó el efecto de un estrés térmico moderado (45°C, 1 h), aplicado sobre la biomasa producida en el fermentador y/o en las células resuspendidas en la solución de secado.

Se produjo biomasa de *L. rhamnosus* 64 en un fermentador de 2 L (Sartorius Biostat A plus) inoculado (1% v/v) con un cultivo *overnight* (16 h, 37°C). Como medio de cultivo se utilizó permeado de suero de quesería reconstituido (9% p/v) (Arla Foods, Porteña, Córdoba, Argentina) suplementado con 2,5 g/L de extracto de levadura, 2,5 g/L de triptona y 5 mL/L de solución Mg-Mn (MgSO₄ 2% p/v y MnSO₄ 0,4% p/v). La fermentación se realizó bajo condiciones de anaerobiosis con flujo de CO₂ (0,2 L/min, agitación 200 rpm), manteniéndose a pH 6 constante por adición automática de una solución estéril de Na₂CO₃ (211,96 g/L) / NaOH (160 g/L). De cada fermentación se tomaron 4 alícuotas de 400 mL y se llevó a cabo el procedimiento que se presenta en la Figura 34. Todas las muestras se secaron spray en una solución de suero de queso - almidón (20% p/v, relación 1:1) con las condiciones de secado optimizadas según el ítem anterior (temperatura de entrada 130°C, temperatura de salida 79°C, caudal de alimentación 15 (4,5 mL/min) y flujo de aire de 40 mm (473 L/h). La viabilidad celular se determinó por recuentos en agar MRS (Biokar) (48 h, 37°C, aerobiosis) previo y posterior al secado spray.

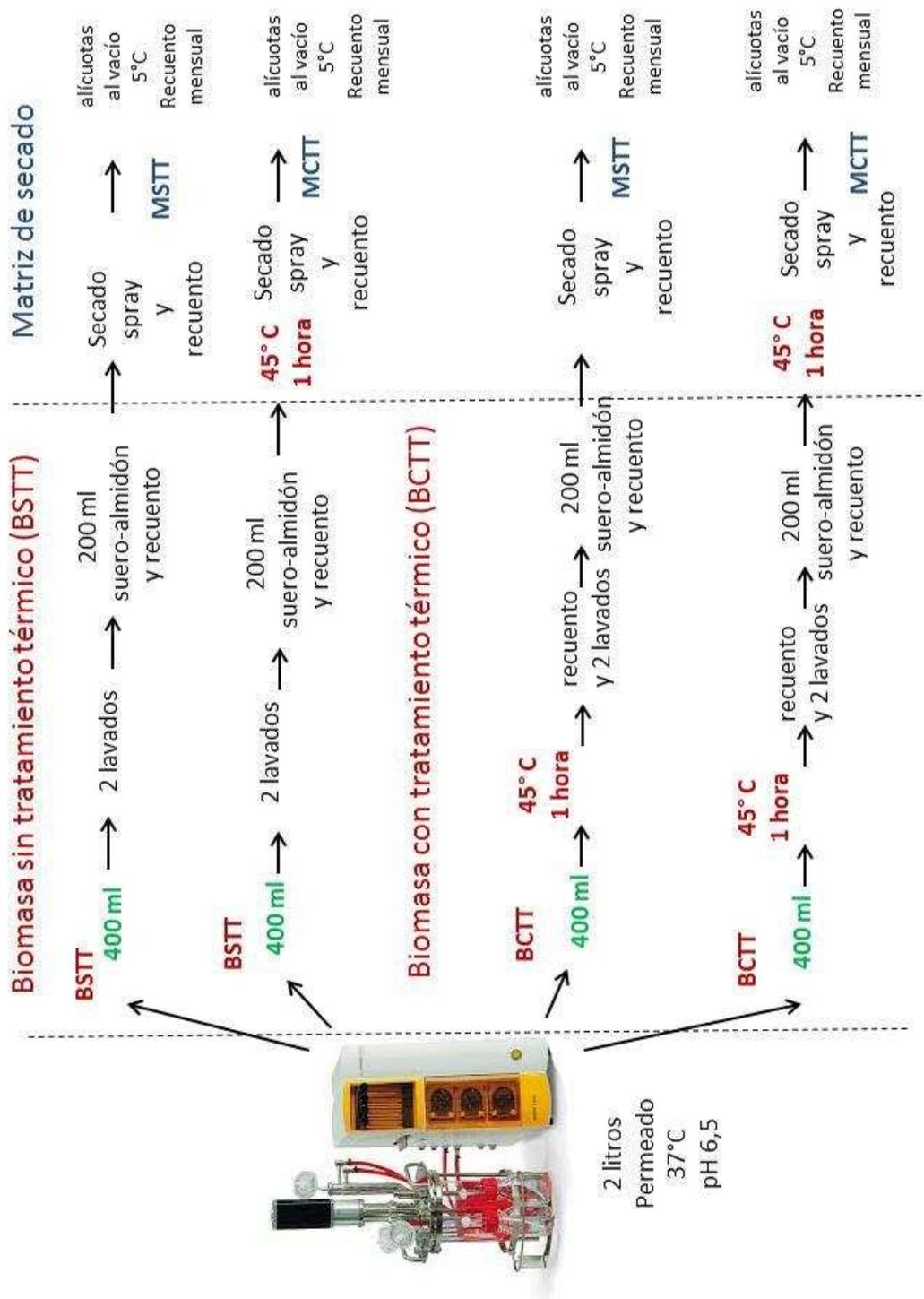


Figura 34: Diagrama de trabajo para la aplicación de estrés térmico moderado (45°C, 1 h) sobre la biomasa de *L. rhamnosus* 64 directamente en el fermentador y/o sobre las células resuspendidas en la solución de secado.

2.4 Secado spray a escala piloto de *L. rhamnosus* 64.

Esta actividad se realizó en el Laboratorio de Productos Funcionales de la Facultad de Zootecnia e Ingeniería de Alimentos de la Universidad de San Pablo (Pirassununga, Brasil) y bajo la supervisión de la Dra. Carmen Fávaro-Trindade. Debido a la imposibilidad de producir biomasa en fermentador en el lugar de trabajo, para estos ensayos, se obtuvieron cultivos de la cepa en estudio en botellas de 1 L a pH libre utilizando el medio de cultivo optimizado basado en permeado de suero de queso (Run 20) (37°C, 18 h, aerobiosis). La biomasa producida se centrifugó (5000 rpm, 15 min, 5°C) y se resuspendió en 1 L de diferentes soluciones de secado con 20% de sólidos totales (Tabla 14). Previo al secado, a las muestras correspondientes se les realizó el tratamiento térmico (TT) 45°C durante 1 hora sobre la matriz de secado para evaluar el efecto sobre las microcápsulas. La deshidratación se realizó en un secadero spray escala piloto LABMAQ (Fig. 35). Las condiciones de secado fueron: temperatura de entrada: 125°C, temperatura de salida: 75°C, caudal de alimentación: 20 mL/min (sugeridas por la experiencia previa del grupo).

Tabla 14: Matrices de secado utilizadas para deshidratar *L. rhamnosus* 64 en un secadero spray piloto (LABMAQ).

Matriz de secado	20% de sólidos totales, en relación:
Suero de queso – almidón.	1:1
Suero de queso – almidón – WPC.	2:1:1
Suero de queso – WPC – maltodextrina.	2:1:1

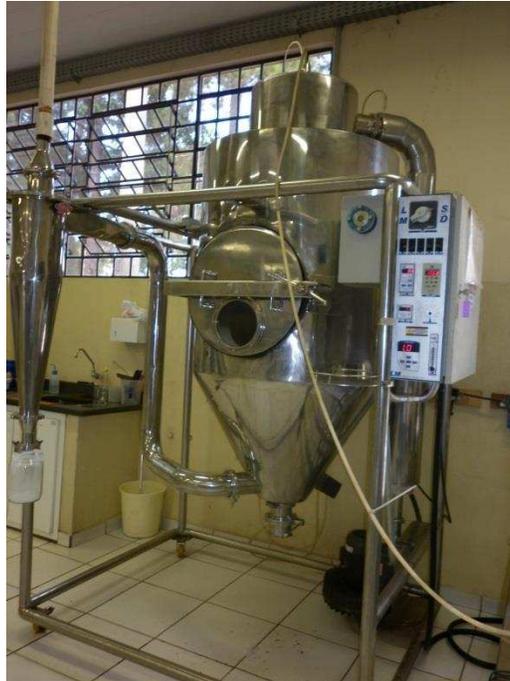


Figura 35: Secadero spray escala piloto LABMAQ (FZEA, Universidad de San Pablo, Brasil).

2.4.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS.

Se determinó la morfología de las microcápsulas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) empleando un microscopio Tabletop Hitachi (Tokio, Japón) TM 3000, con el programa TM 3000. Las muestras se adhirieron con una cinta de doble faz sobre portamuestras cilíndricos, se metalizaron con una capa de oro y se examinaron empleando un voltaje de aceleración de 20 kV.

La actividad de agua (a_w) se determinó mediante un equipo AQUALAB (Decagon Devices, Pullman, EUA) (Fig. 36). La humedad se determinó mediante un analizador halógeno de humedad modelo MB 35 - Ohaus (Ohio, Estados Unidos).

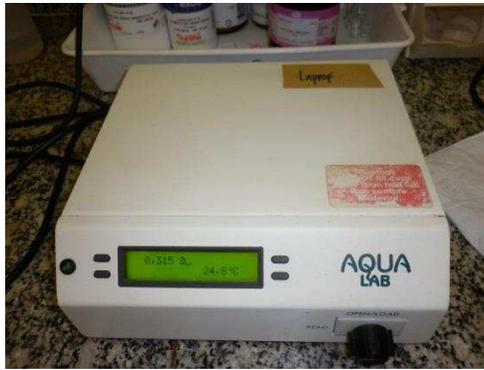


Figura 36: Equipamiento para la determinación de a_w (AQUALAB).

El tamaño y distribución de tamaño de las partículas se evaluó con un analizador de partículas por difracción laser SALD -201V, Shimadzu (Tokio, Japón) (Fig. 37). Se utilizó etanol como medio de sedimentación y 30 mg de muestra.

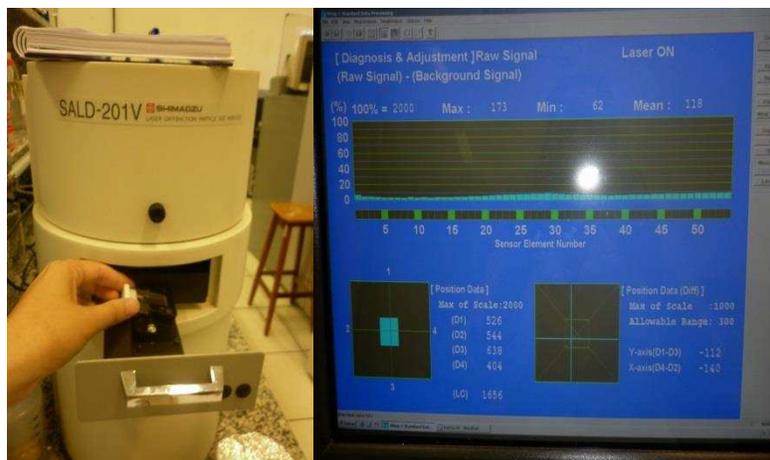


Figura 37: Equipamiento para determinación de tamaño y distribución de partículas.

2.5. Secado spray a escala industrial de *L. rhamnosus* 64.

Se produjo biomasa de *L. rhamnosus* 64 en dos fermentadores Sartorius Biostat A plus (5 L), utilizando las condiciones del ítem 2.3. Los fermentadores se inocularon (1%

v/v) con un cultivo *overnight* (16 h, 37°C) de la cepa en el mismo medio de cultivo. La biomasa producida se concentró utilizando una centrífuga continua CEPA (New Brunswick, USA), y se re suspendió en 10 L de la matriz de secado correspondiente a los ensayos realizados.

El secado spray se realizó en la planta industrial de la empresa Galaxie S.A. (Sarandí, Buenos Aires, Argentina). Se utilizó un secadero spray Galaxie Modelo 1612 (Fig. 38), el cual es el modelo más pequeño de la línea de secaderos spray industriales producidos por esta empresa. Por cuestiones de tiempo, distancia y costo, se realizaron dos ensayos, los cuales podrían considerarse como exploratorios o preliminares.

En el primer ensayo se realizó el secado spray de *L. rhamnosus* 64 resuspendido en 10 L de suero de queso - almidón (20% p/v, relación 1:1), los rangos de temperatura de entrada utilizados fueron TE: 170° - 186°C, para obtener un rango de temperaturas de salida que osciló entre 71 – 88°C. Si bien a menor escala se trabajó a temperaturas de entrada inferiores, el equipo disponible a nivel industrial no poseía las características de ajuste fino de los equipos de laboratorio, y por lo tanto no fue posible estabilizarlo a menores temperaturas de entrada que las que se utilizaron. Se conservaron muestras de todas las condiciones obtenidas para determinar el efecto de la temperatura de salida. Se determinó la viabilidad pre y post-secado en agar MRS (37°C, 48 h, anaerobiosis) y la supervivencia a los 180 días de almacenamiento a 5°C de los polvos obtenidos, envasados al vacío en bolsas adecuadas para el producto (Cryovac, Buenos Aires, Argentina).

En el segundo ensayo, se utilizó un cultivo de *L. rhamnosus* 64 con tratamiento térmico previo (45°C 1h, aplicado sobre la biomasa en el fermentador), el cultivo de la cepa en estudio fue deshidratado en dos matrices de secado (20% p/v de sólidos totales): suero de queso - almidón (1:1) y suero de queso - WPC - maltodextrina (2:1:1). Se utilizó una temperatura de entrada de 173°C, y una temperatura de salida de 79°C. Se determinó la viabilidad en agar MRS (37°C, 48h, anaerobiosis) antes y después del secado spray y luego de la conservación a 5°C durante 180 días de los polvos obtenidos, envasados al vacío.



Figura 38: Secadero spray industrial Galaxie modelo 1612.

2.6. Análisis estadístico.

Los parámetros de secado se optimizaron mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM), utilizando un diseño central compuesto (DCC). El ajuste de los modelos se hizo por la metodología de los mínimos cuadrados, y el riesgo de error asumido fue de $\alpha=0,05$. Los paquetes estadísticos utilizados fueron R (3.1.2) y SAS 9.2.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Optimización de las condiciones de secado spray para obtener la mayor supervivencia de *L. rhamnosus* 64.

A pesar de la amplia demanda de probióticos de bajo costo, el uso de secado spray como tecnología para su producción es aún un desafío debido al impacto negativo que puede tener sobre la integridad celular durante el proceso de deshidratación y a lo largo de la conservación (Behboudi-Jobbehdar y col., 2013). Con el objeto de asegurar la

estabilidad del producto durante el almacenamiento se debe encontrar una solución de compromiso entre mantener la viabilidad de los microorganismos probióticos (menor temperatura de salida posible) y obtener una humedad adecuada (mayor temperatura de salida posible). Un calentamiento excesivo durante el secado (alta temperatura de entrada y de salida, baja velocidad de alimentación) puede conducir a un daño celular térmico sobre las macromoléculas microbianas (proteínas y ácidos nucleicos), la modificación del estado físico de la membrana citoplasmática y la peroxidación de la membrana lipídica (Soukoulis y col., 2013). Por otro lado, se requieren altas temperaturas para evaporar el agua a lo largo del proceso y obtener un porcentaje de humedad entre 4 - 6 % que garantice la estabilidad de los cultivos deshidratados durante el almacenamiento (Zayed y Roos, 2004; Ananta y col., 2005).

En el Capítulo 1 de este trabajo se realizó la optimización del secado spray de la matriz suero de queso – almidón (sin agregado de células viables), priorizando las variables humedad (4 - 6%) y temperatura de salida (< a 85°C para promover una mayor supervivencia de los microorganismos probióticos). La temperatura de entrada del aire de secado puede influir en la eficiencia de secado, en el contenido de agua residual y las propiedades del producto final, este parámetro junto con la alimentación y el flujo de aire de secado, son responsables de la evaporación del agua. Por otro lado, la temperatura de salida responde a la temperatura de entrada, al flujo de aire, al caudal de alimentación y a la cantidad de sólidos. Esta interdependencia de las variables es lo que hace que controlar el proceso sea una cuestión compleja (Cal y Sollohub, 2010).

En la optimización realizada en este capítulo se evaluó el porcentaje de supervivencia como la principal variable de respuesta. El flujo de aire y la temperatura de entrada mostraron un efecto sobre la supervivencia de *L. rhamnosus* 64 (Fig. 39), mientras que no se observó influencia del caudal de alimentación (CA), ni interacción entre los 3 factores evaluados ($p = 0,054$). De todas formas el CA es un parámetro a controlar ya que afecta la temperatura de salida, la humedad e indirectamente influye sobre la viabilidad de los microorganismos y la estabilidad del producto a largo plazo. Si la temperatura del aire de entrada se mantiene constante, por ejemplo, una disminución en el CA se

traducirá en un aumento de la temperatura de salida (Oliveira y Petrovick, 2009) mientras que un aumento podría provocar el secado incompleto y el pegado del material en las paredes de la cámara de secado o el ciclón.

Según el modelo de superficie de respuesta, la máxima supervivencia se obtuvo utilizando una temperatura de entrada 120°C, un flujo de aire de 38 mm (450 L/h) y un caudal de alimentación de 25% (7,5 mL/min) (Fig.39), pero estas condiciones no fueron las óptimas para la humedad (Fig. 40). Behboudi-Jobbehdar y col. (2013) obtuvieron menos pérdida de viabilidad de *L. acidophilus* NCIMB 701748 cuando aumentaron el caudal de alimentación de 6 a 7,5 mL/min, pero al aumentar el caudal de alimentación a 9 mL/min no hubo una mayor termoprotección y se observó un impacto perjudicial sobre la a_w .

La temperatura del aire de salida no es un parámetro independiente, ya que depende en mayor o menor medida de muchos otros parámetros del proceso tales como la velocidad de flujo de aire (Wang y col., 2004), las condiciones de entrada de aire (humedad y temperatura) (O'Riordan y col., 2001, Sunny-Roberts y Knorr 2009), la velocidad de alimentación (Gardiner y col., 2000, Lian y col., 2002), la concentración de sólidos, así también como del tamaño de la gota (Boza y col., 2004, Santivarangkna y col., 2007). En este ensayo el CA tuvo un efecto significativo sobre la temperatura de salida ($p = 0,0311$), a medida que aumentó el mismo de 15% a 20% (con una temperatura de entrada y flujo de aire constante, 130°C y 40 mm respectivamente), se observó una disminución de la temperatura de salida de 80°C a 75°C.

Cuando se evaluó el efecto de la temperatura de entrada, flujo de aire y CA sobre la humedad, se observó una interacción significativa entre los 3 factores ($p = 0,00196$). El CA tuvo una gran incidencia sobre el porcentaje de humedad de los polvos obtenidos ($p = 0,02691$).

Debido a que el CA no tiene un efecto significativo sobre la supervivencia ($p = 0,1502$), se lo utilizó al 15% (4,5 mL/min) para obtener un porcentaje de humedad adecuado (Fig. 41). Las condiciones optimizadas finalmente fueron, temperatura de entrada 130°C, flujo de aire 38 mm (450 L/h) y CA 15% (4,5 mL/min), logrando un

porcentaje de humedad de 4 – 4,5% y una supervivencia de 80 – 90% (ver la tabla de condiciones de secado según el diseño de superficie de respuesta en Anexo II).

Las condiciones optimizadas en el capítulo 1 para secar spray suero de queso – almidón (sin *L. rhamnosus* 64) determinaron una temperatura de salida menor a 85°C y la obtención de un polvo con humedad de 4 - 6% (p/p) al utilizar una temperatura de entrada de 145-155°C, flujo de aire 30 mm (357 L/h) y un caudal de alimentación de 4,5 mL/min. Las diferencias entre las condiciones de secado de la solución suero de queso – almidón incluyendo o no a la cepa, se observan en la Tabla 15.

Tabla 15: Condiciones optimizadas para el secado de suero de queso – almidón con la adición o no de *L. rhamnosus* 64.

Solución de secado	TE	TS	FA	CA
Suero de queso - almidón	145°C	< 85°C	30 mm	15 %
Suero de queso - almidón con <i>L. rhamnosus</i> 64	130°C	75°C	38mm	15 %

TE: temperatura de entrada; TS: temperatura de salida; FA: flujo de aire (mm de columna); CA: caudal de alimentación (%).

¹mm de columna: 30 mm a 357 L/h; 38 mm 450 L/h..

²Caudal de alimentación: 15% = 4,5 mL/min.

Hamsupo y col. (2005) obtuvieron tasas de supervivencia más altas de *L. reuteri* KUB-AC5 a 70°C de temperatura de salida con una variación de la supervivencia del 83-93% dependiendo del medio de cultivo. La supervivencia de una cepa termosensible de *L. paracasei* durante el secado por aspersion osciló entre el 97% (con temperatura de salida 70-75 °C) a 0% (temperatura de salida 120°C) (Gardiner y col., 2000). Otras cepas de lactobacilos secadas spray en leche descremada con una temperatura de salida de 85°C registraron pérdidas de viabilidad de 0,16 a 0,95 órdenes log, evidenciando la cepa dependencia de este fenómeno (Páez y col., 2012).

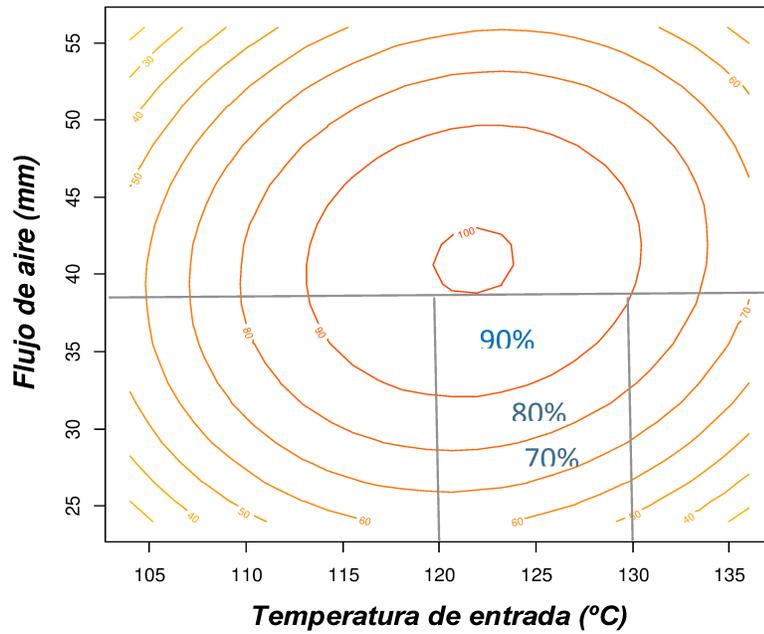
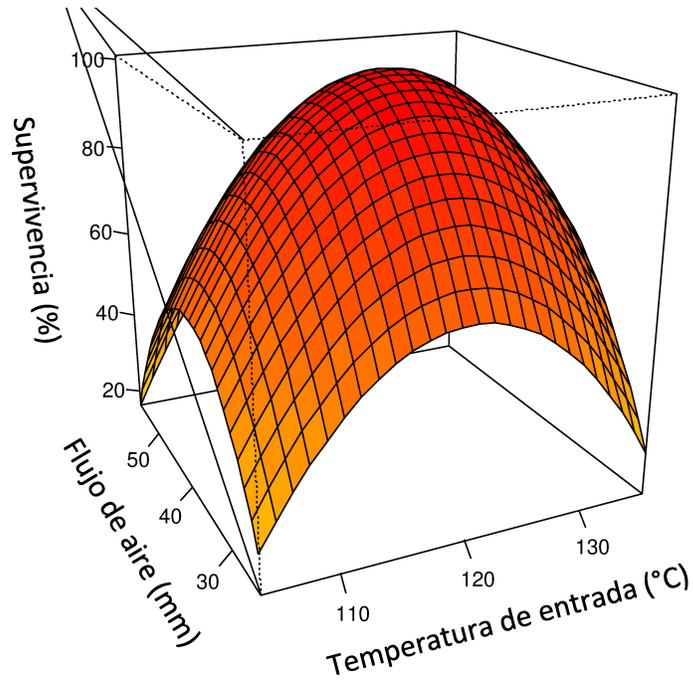


Figura 39: Supervivencia (%) de *L. rhamnosus* 64 al secado spray. Efecto de la temperatura de entrada y el flujo de aire, con un caudal de alimentación constante (15% = 4,5 mL/min).

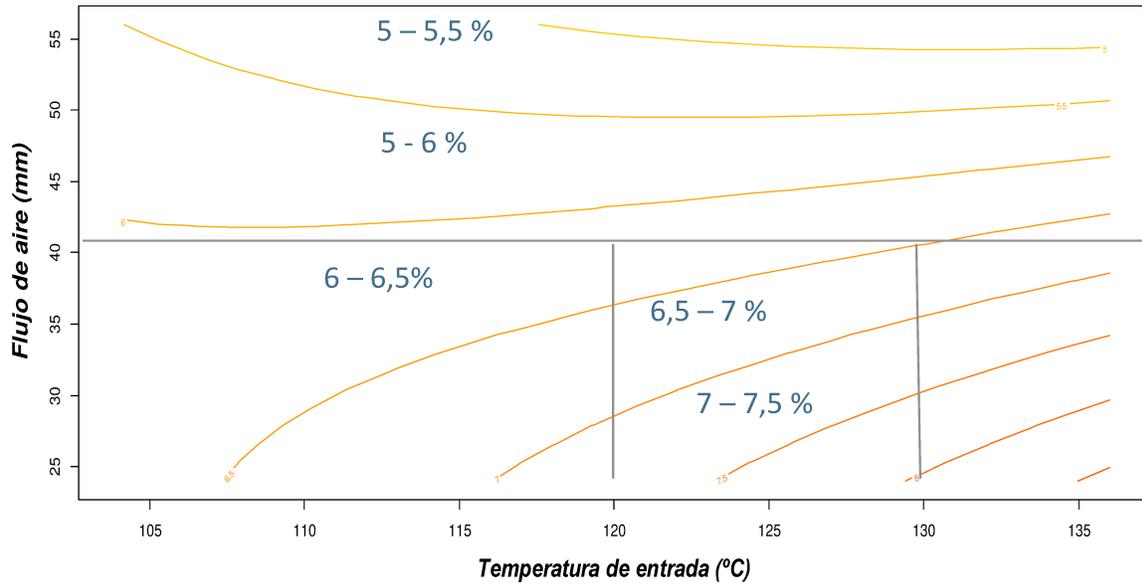


Figura 40: Efecto de la temperatura de entrada y el flujo de aire, con un caudal de alimentación constante (25% = 7,5 mL/min) sobre el porcentaje de humedad.

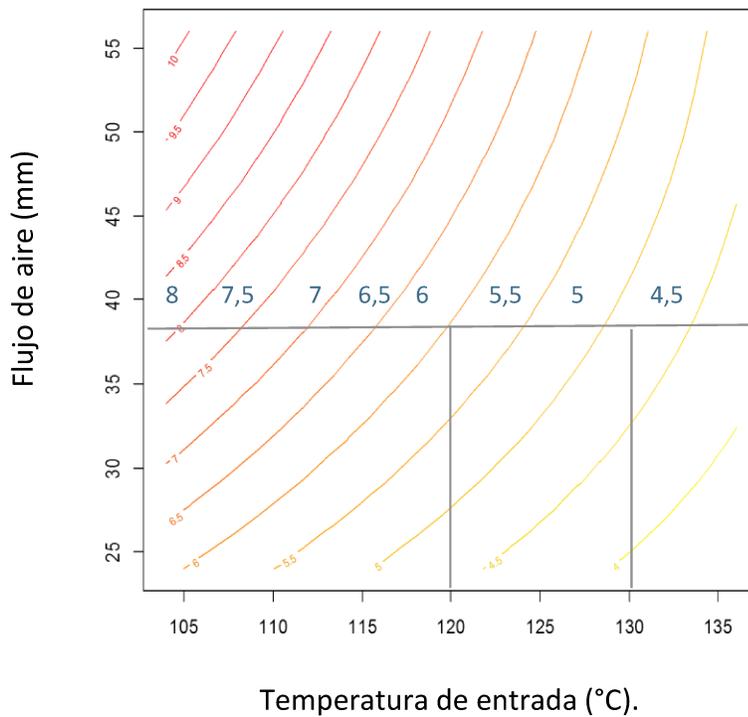


Figura 41: Gráfico de contorno donde la variable respuesta es la humedad (líneas color naranja) con un caudal de alimentación constante 15% (4,5 mL/min).

3.2 Efecto de la aplicación de un estrés térmico moderado sobre la sobrevivencia de *L. rhamnosus* 64 deshidratado en suero de queso – almidón.

Algunas veces las aplicaciones industriales requieren una cepa específica que, por sus propiedades, no puede ser reemplazada con otra alternativa de mayor tolerancia al estrés. En estos casos la pre-adaptación o la aplicación de un pre-tratamiento térmico puede ser una opción para incrementar la supervivencia celular contra condiciones adversas (Fu y Chen, 2011). Por lo general, un aumento de temperatura de 10 °C por encima de la temperatura óptima de crecimiento conduce a un shock térmico (Teixeira y col., 1994). En estudios previos se evaluó la pre-adaptación (52°C, 15 min) de las células al calor como inductora de respuesta ante el shock térmico, aplicado sobre el medio de cultivo MRS y sobre leche descremada a fin de mejorar la supervivencia celular durante el secado spray (Desmond y col., 2001; Desmond y col., 2004). Según los resultados obtenidos en el Capítulo 2 de esta tesis la muerte celular post secado spray en muestras que recibieron la aplicación de un estrés térmico moderado en el fermentador a 52°C durante 15 min o 45°C durante 1h fue de $1,73 \pm 0,11$ log UFC/mL y de $0,66 \pm 0,21$ log UFC/mL respectivamente.

En este ensayo se evaluó el efecto de la aplicación o no de un estrés moderado (45°C, 1h) sobre el medio de cultivo (Run 20) y/o sobre la matriz de secado (suero de queso – almidón, 20 % p/v) post secado spray (Fig. 42) y durante el almacenamiento de *L. rhamnosus* 64.

En la Fig. 42 se observa que la aplicación del tratamiento térmico no tuvo un efecto protector sobre la supervivencia al secado spray.

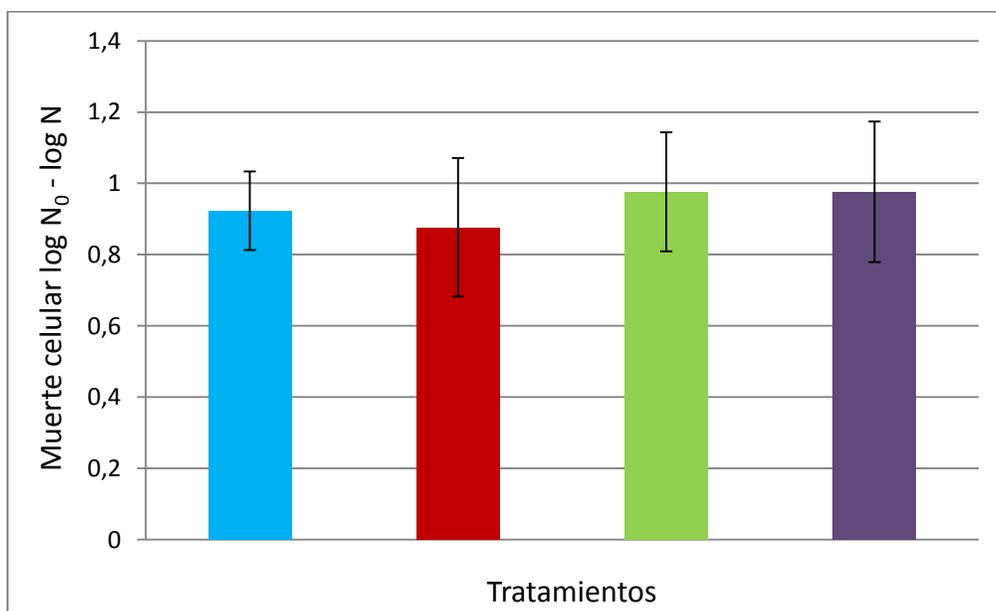


Figura 42: Muerte celular (diferencia de los logaritmos de UFC/mL antes y después del secado spray de *L. rhamnosus* 64 en suero de queso - almidón (20% p/v), luego de la aplicación de un doble estrés térmico moderado (45°C, 1h) al cultivo en el fermentador y en la matriz de secado (■), sólo a la biomasa en el fermentador (■), sólo a la biomasa resuspendida en la matriz de secado (■), respecto a un control sin tratamiento térmico (■).

En la Fig. 43 se observa que todos los tratamientos tuvieron una pérdida de viabilidad significativa a través del tiempo ($p < 0,05$), pero el comportamiento fue diferente según el tratamiento evaluado. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos sobre la viabilidad durante la conservación de los polvos a 5°C a tiempo 0, 60 y 120 días, pero esta diferencia se manifestó a los 180 días.

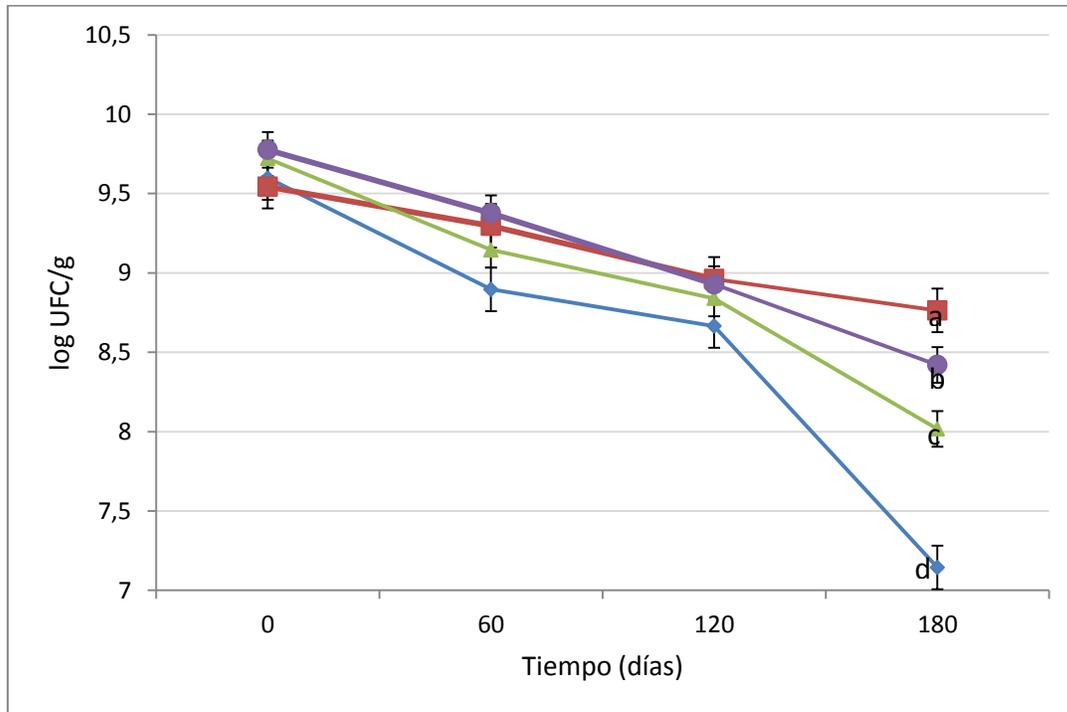


Figura 43: Recuento de células viables de *L. rhamnosus* 64 durante la conservación a 5°C de cultivos deshidratados por secado spray en suero de queso - almidón (20% p/v, relación 1:1), luego de la aplicación de un doble estrés térmico moderado (45°C, 1h) al cultivo en el fermentador y en la matriz de secado (◆), sólo a la biomasa en el fermentador (■), sólo a la biomasa resuspendida en la matriz de secado (▲), respecto a un control sin tratamiento térmico (●). Diferentes letras en los símbolos indican diferencias significativas a los 180 días ($p < 0,05$).

Para analizar mejor esta diferencia, los resultados obtenidos a los 180 días de conservación se presentan en la Fig. 44. Cuando el estrés térmico se aplicó directamente sobre la biomasa en el fermentador (BCTT) hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) respecto a los cultivos que recibieron el doble tratamiento térmico (en la biomasa en el fermentador y en la matriz de secado). Cuando el tratamiento se aplicó sólo sobre la matriz de secado (BSTT), la supervivencia fue

significativamente menor ($p = 0,0205$) que en los cultivos que no recibieron tratamiento (control) y que el cultivo que recibió el tratamiento térmico en el fermentador.

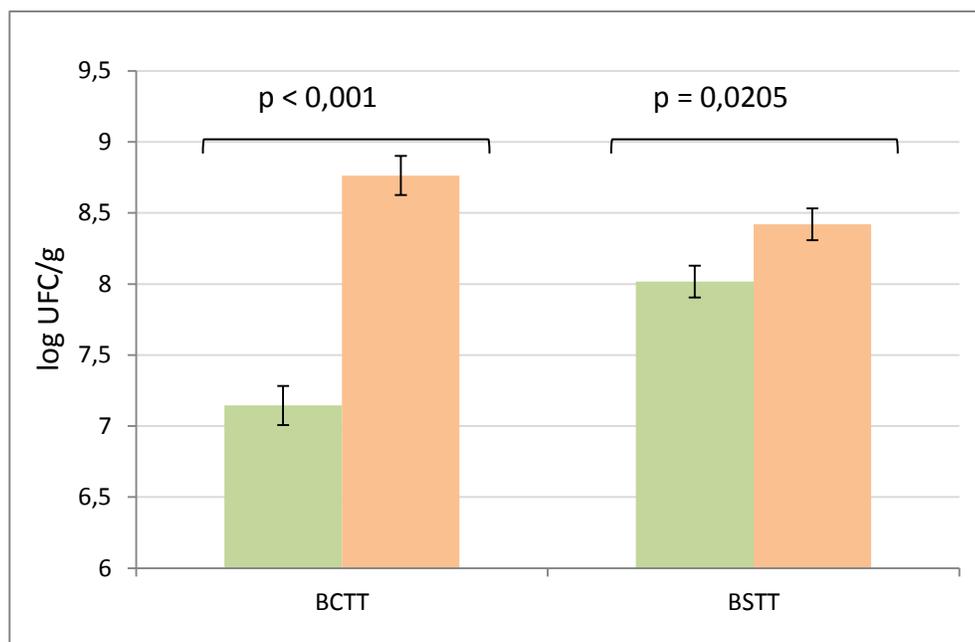


Figura 44: Recuento de células viables de *L. rhamnosus* 64 a los 180 días de conservación a 5°C. BCTT: biomasa con tratamiento térmico en el fermentador, BSTT: biomasa sin tratamiento térmico en el fermentador. Tratamiento térmico en la matriz de secado (■), matriz de secado sin tratamiento térmico (■).

La aplicación de un estrés térmico moderado (45°C, 1h) sobre la biomasa en el fermentador (directamente sobre el medio de cultivo), tuvo un efecto positivo a los 180 días de almacenamiento (Fig. 44), a pesar de ser moderado, es un indicador de la factibilidad de aplicación de estos tratamientos y los resultados demuestran que la efectividad se observó al ser aplicado directamente en el fermentador y no en la biomasa una vez resuspendida en la matriz de secado. Además se observa que un doble tratamiento térmico resultó perjudicial. Estos resultados coinciden con lo reportado por Desmond y col. (2001); Gardiner y col. (2002); Anekella y Orsat, (2013) quienes postulan

que en función de los medios de adaptación, un tratamiento térmico subletal puede aumentar la supervivencia de lactobacilos notablemente, durante y después del secado spray. Gardiner y col., (2000) Corcoran y col., (2004) y Paez y col., (2012) aplicaron un shock térmico (52°C, 15 min) en leche descremada reconstituida. Anekella y Orsat, (2013) aplicaron un shock térmico (50°C y 52,5°C por 12 min para *L. acidophilus* y *L. rhamnosus*, respectivamente) en MRS y en jugo de frambuesa. El medio MRS fue mejor que el jugo de frutas (para las dos cepas evaluadas) como medio para aplicar el pre tratamiento. Según lo expuesto, y lo observado en los Capítulos 1 y 2 al producir la biomasa en el medio formulado M2 o en Run 20, la composición de los medios en el que se adaptan los microorganismos pueden influir en la resistencia de las células expuestas a altas temperaturas y tienen un efecto significativo sobre la supervivencia (Teixeira y col., 1994; Teixeira y col., 1995; Desmond y col., 2001; O'Riordan y col., 2001; Corcoran y col., 2004 Anekella y Orsat, 2013).

En base a los resultados presentados se puede concluir que la adaptación térmica (45°C, 1h) aplicada directamente en el fermentador ejerce una protección más efectiva, que cuando se realiza sobre la solución de secado, durante el almacenamiento de *L. rhamnosus* 64 secado spray a largo plazo. Una hipótesis podría relacionar esta efectividad con el menor contenido de sólidos totales del medio de cultivo en el fermentador (10% de sólidos totales), respecto a la matriz de secado (20% de sólidos totales). En el caso de la matriz de secado, la misma carga térmica podría haberse “diluido” por el mayor contenido de sólidos respecto al medio de cultivo en el fermentador, y ser entonces menos efectiva sobre las células, ya que parte de la misma fue absorbida por las macromoléculas del suero de queso y el almidón y se perdió así efectividad o carga térmica sobre las células allí resuspendidas.

3.3 Secado spray a escala piloto de *L. rhamnosus* 64.

En este ensayo se deshidrató *L. rhamnosus* 64 en un secadero spray piloto y se evaluó el efecto de un tratamiento térmico moderado sobre la matriz de secado utilizando diferentes materiales de pared. Se evaluó la morfología de las microcápsulas y la supervivencia al secado y durante el almacenamiento.

El uso de ingredientes macromoleculares del tipo proteínas y carbohidratos ha sido sugerido para estabilizar a los microorganismos durante el almacenamiento, principalmente debido a su capacidad de afectar las propiedades fisicoquímicas de las matrices deshidratadas, es decir, la actividad de agua, contenido de humedad y la temperatura de transición vítrea, entre otras (Fu y Chen 2011; Santivarangkna y col., 2011). Aunque matrices de secado tales como maltodextrina, almidón hidrolizado, oligosacáridos, fibra dietética y azúcares se han utilizado para estabilizar una amplia gama de bacterias probióticas, el impacto de componentes lácteos como lactosa, caseína y proteínas de suero ha sido menos estudiado (Soukoulis y col., 2013).

En este trabajo de tesis se utilizó el suero de queso como el principal material de pared de las microcápsulas como forma de valorizar este subproducto lácteo. Según De Castro y col. (2012) el suero ha demostrado ser un buen agente de encapsulación para mantener la viabilidad de *Bifidobacterium lactis* Bb-12. Además de la temperatura de salida, el material de encapsulación y el contenido de sólidos tienen un efecto directo sobre la estabilidad de las microcápsulas.

Además del suero de queso, se planteó la adición de almidón como material de pared ya que se demostró que la matriz leche descremada con adición de almidón mejoraría no sólo la supervivencia de los microorganismos, sino también las características del producto (Menshutina y col., 2010; Paez y col., 2013). La matriz suero de queso – almidón (20% p/v, relación 1:1) se tomó como referencia para la mayoría de

los ensayos realizados en esta tesis. La incorporación de un tercer material de pared (maltodextrina, WPC) fue para favorecer una relación proteína – carbohidrato (1:1) entre los materiales secundarios de pared que se propone como una condición favorable para la supervivencia de las bacterias probióticas (Chavez y Ledebøer, 2007; Soukoulis y col., 2013). En la selección de materiales de pared para encapsular, la maltodextrina es una buena opción teniendo en cuenta el bajo costo y la efectividad, además por su característica para reducir propiedades como el “caking” (presencia de partículas aglomeradas, polvo compactado) y “stickiness” (pegajosidad), dos defectos que aparecen durante el secado spray, sobretodo en productos con alto contenido de lactosa (Anekella y Orsat, 2013). La utilización de WPC se basa en su efecto protector demostrado para las proteínas de suero. Riveros y col. (2009) reportaron que al comparar leche descremada en polvo con permeado de suero, cuyo componente principal es lactosa, la supervivencia de *L. acidophilus* en idénticas condiciones de secado se redujo a la mitad cuando se deshidrató en permeado de suero de queso. Además, las proteínas del suero son en la actualidad un componente importante de la dieta humana, están presentes en una gran variedad de alimentos y han recibido una considerable atención por ser utilizadas como matrices adecuadas para el suministro de compuestos bioactivos y como potenciales precursores de biopéptidos que se pueden formar incluso durante la digestión (Ramos y col., 2015).

3.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS.

La caracterización de las matrices deshidratadas es un aspecto relevante ya que la obtención de sistemas de forma y tamaño homogéneo facilita su manipulación y aplicación como ingredientes en alimentos. De acuerdo con la literatura disponible sobre el secado por pulverización, diferentes proteínas pueden dar lugar a diversos tipos de morfología de partículas (Chan, y col., 2009; Shi, y col., 2011; Sadek y col., 2015).

Para analizar las características morfológicas de las cápsulas, se recurre normalmente a técnicas de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM)

que también permiten detectar la posible agregación de las partículas, así como determinar el tamaño de las mismas. El análisis SEM ha sido empleado frecuentemente para examinar las propiedades de superficie y la estructura de un gran número de materiales en el campo de los alimentos. En esta técnica, un haz de electrones es utilizado para escanear la superficie de la muestra, los cuales se detectan posteriormente dando información acerca de la topografía y morfología del material. Las muestras deben encontrarse libres de humedad y debe someterse a alto vacío.

Previo al proceso de secado spray, los agentes encapsulantes presentaron formas irregulares y de tamaños menores a 100 μm (Fig. 45), mientras que luego de la deshidratación se obtuvieron esferas irregulares, de tamaño aproximado $< 12 \mu\text{m}$ (Figuras. 46 a 49).

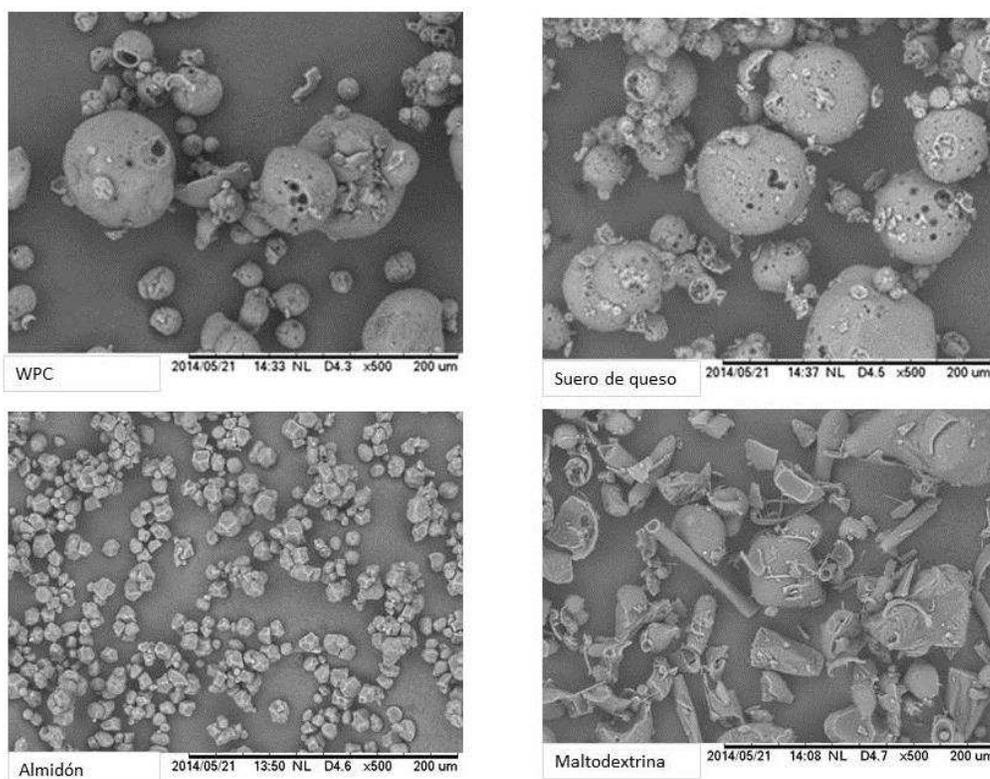


Figura 45: Morfología de las matrices (polvos) utilizadas para deshidratar *L. rhamnosus* 64 (suero de queso, almidón, WPC y maltodextrina) mediante secado spray.

El tamaño de las partículas es importante, ya que partículas de mayor tamaño requieren mayores tiempos de secado con la consecuente inactivación térmica del microorganismo que contiene (Peighambardoust y col., 2011). El tamaño de las microcápsulas debe ser lo suficientemente grande como para lograr un buen efecto de protección y a la vez lo suficientemente pequeño como para que las cápsulas no sean sensorialmente perceptibles. Mientras que algunas microcápsulas con diámetros de alrededor de 1 mm no se pueden detectar sensorialmente en salchichas o queso, estos tamaños de cápsulas tienen un efecto adverso sensorial en productos fluidos como el yogur (Heidebach y col., 2011), en el caso de que sean microcápsulas elaboradas con materiales insolubles en medio acuoso. Para los productos lácteos, un tamaño de aproximadamente 100 μm es generalmente considerado como el umbral para evitar impactos negativos sobre las propiedades sensoriales en la mayoría de los productos (Hansen y col., 2002, Heidebach y col., 2011).

Luego del secado spray, se observó un cambio en la morfología de los componentes, coincidiendo con Wrolstad y col., (2012). En las muestras con almidón de maíz se observó la aglomeración de las partículas (Fig. 47) en contraste con el uso de maltodextrina que presentó gránulos más dispersos (Fig. 49). El tamaño medio de las micropartículas obtenidas con la matriz suero de queso - almidón sin TT fue de 3,29 μm , mientras que con el TT fue de 5,25 μm , esta diferencia se podría atribuir a que el tratamiento térmico desnaturizó las proteínas de suero favoreciendo la aglomeración de las micropartículas. Según De Castro y col. (2012) la desnaturalización por calor de las proteínas de suero de leche influye en las características de emulsificación y por lo tanto en las propiedades de microencapsulación. Se demostró que el secado por pulverización da lugar a la desnaturalización y a la agregación de proteínas de suero, lo que mejora su adsorción en la interfase y se forma una capa delgada, de tipo gel, como se observa en la Fig. 46.

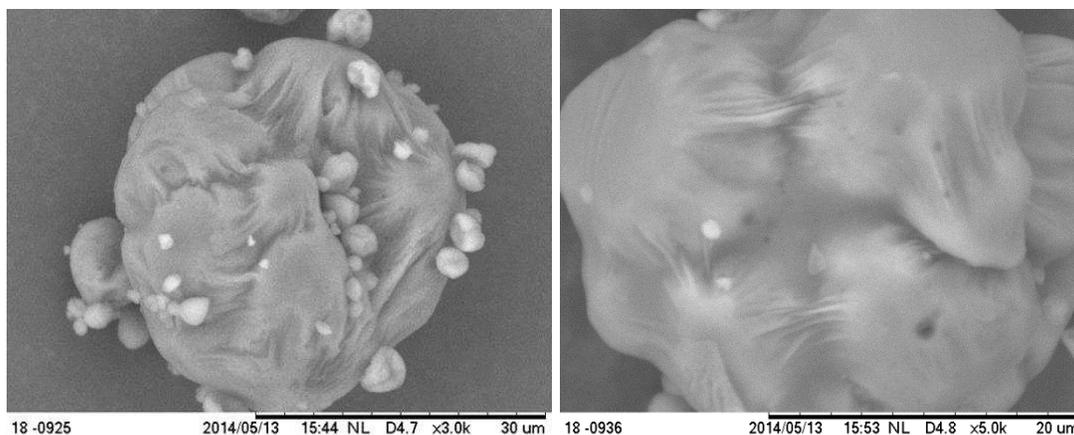


Figura 46: Microcápsulas de en suero de queso – almidón 20% (p/v) conteniendo *L. rhamnosus* 64.

Se observó por microscopía electrónica de barrido la formación de las microcápsulas y la aglomeración de las mismas (Fig. 47). Hubo un efecto importante del tratamiento térmico, sobre la matriz suero de queso - almidón, lo cual se observa como un comportamiento bimodal en el gráfico de distribución y tamaño de partículas (Fig. 47). En general este tipo de distribución se presenta en polvos secados spray con mayor peso específico, las partículas más pequeñas se incluyen en los huecos entre las microcápsulas más grandes, lo que se traduce en un mayor rendimiento del secado (Tonon y col., 2008).

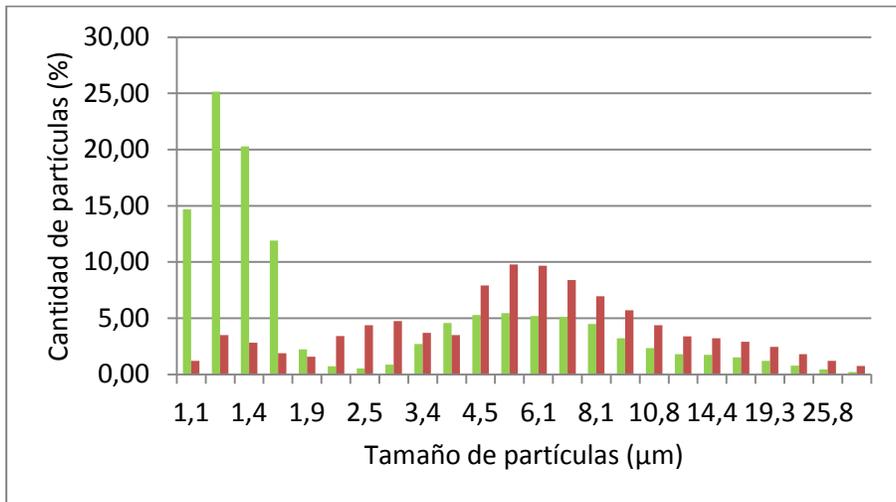
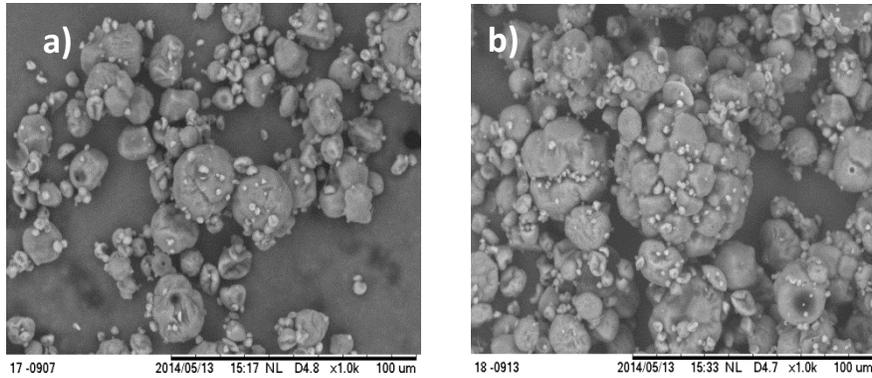


Figura 47: Microscopía SEM de microcápsulas de *L. rhamnosus* 64 obtenidas en suero de queso - almidón (20% p/v, relación 1:1) sin tratamiento térmico (a) y con tratamiento térmico (b). Tamaño y distribución de micropartículas obtenidas sin tratamiento térmico (■) y con tratamiento térmico (■).

Sadek y col. (2014) observaron dos tipos de morfología que fueron claramente identificadas bajo condiciones de secado spray controladas (mediante monodisperse spray dryer: MDSD), esta tecnología permite producir partículas uniformes mediante el secado de gotas monodispersas en un flujo de aire caliente y seco. En el trabajo referenciado se investigaron siete mezclas con diferentes proporciones de proteínas de suero y caseínas. Las partículas de las micelas de caseína se observaron arrugadas y densas, mientras que las partículas de las proteínas de suero de leche eran esféricas y huecas.

En la Fig. 48 se observa el tamaño de las partículas obtenidas al deshidratar *L. rhamnosus* 64 en suero de queso - almidón - WPC (20% p/v, relación 2:1:1) con y sin la aplicación de un tratamiento térmico (el tamaño promedio de las partículas fue de 1,28 y 2,37 μm respectivamente). En general se obtuvieron microcápsulas esféricas con concavidades y deflaciones en la superficie. En la matriz que recibió el tratamiento térmico (Fig. 48 – b) se observaron fisuras, coincidiendo con Sadek y col. (2015) quienes utilizando la proteína de suero de queso obtuvieron partículas esféricas, suaves y con fisuras.

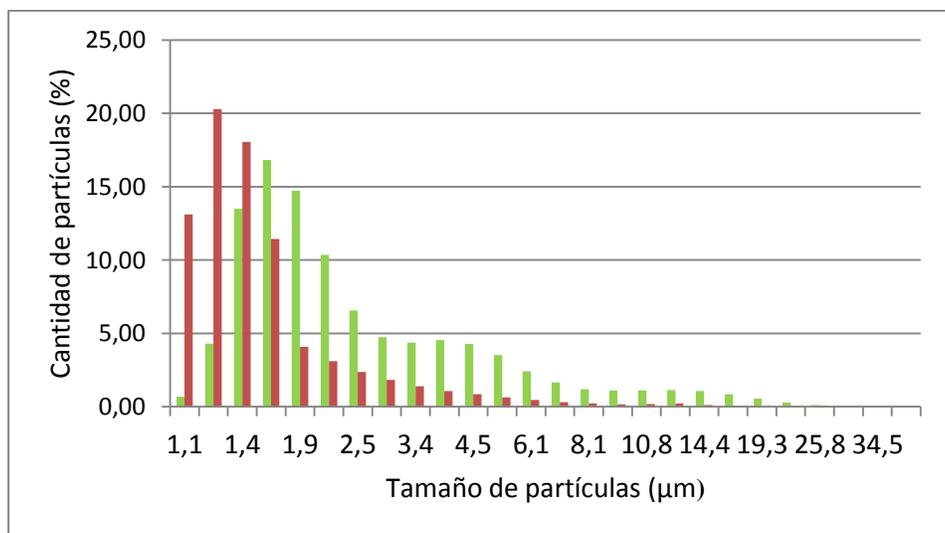
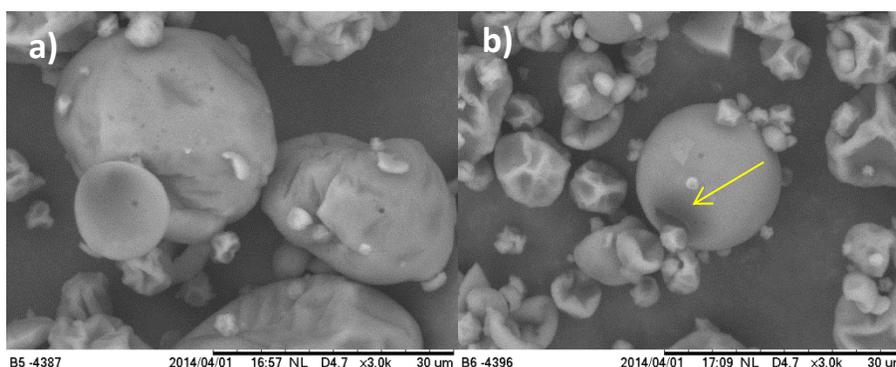


Figura 48: Microscopía SEM de microcápsulas de *L. rhamnosus* 64 obtenidas en suero de queso - almidón - WPC (20% p/v, relación 2:1:1) sin tratamiento térmico (a) y con tratamiento térmico (b). Tamaño y distribución de micropartículas obtenidas sin tratamiento térmico (■) y con tratamiento térmico (■).

En la Fig. 49 se observan las micropartículas obtenidas cuando la cepa en estudio se deshidrató en suero de queso - WPC - maltodextrina (20% p/v, relación 2:1:1) con y sin la aplicación de un tratamiento térmico (45°C, 1h previo al secado y aplicado sobre la matriz de secado). La aplicación o no de este tratamiento, no tuvo efecto sobre el tamaño de partícula (1,62 y 1,4 μm , respectivamente). Las microcápsulas se caracterizaron por presentar forma esférica con concavidades y deflaciones en la superficie, pero sin evidencia de grietas o fisuras. También se observó el efecto "flat ball" (bola plana) (Fig. 49 – a) el cual se ha informado en estudios anteriores y que está directamente relacionado con las condiciones durante el secado, en particular con la penetración de calor y la evaporación del agua y el diseño de la cámara de secado (Barbosa-Cánovas y col., 2005). No hubo un efecto del tratamiento térmico sobre esta matriz, tampoco se evidenciaron diferencias en el tamaño y la distribución de partículas.

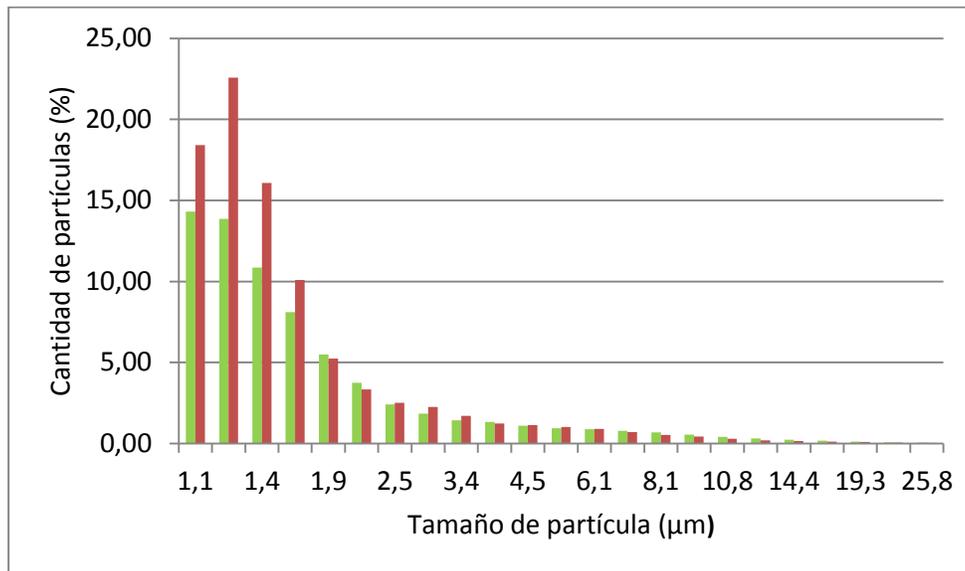
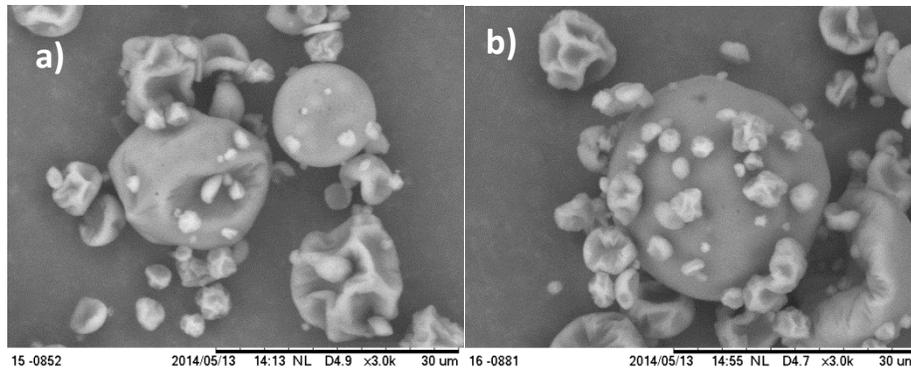


Figura 49: Microscopía SEM de microcápsulas de *L. rhamnosus* 64 obtenidas en suero de queso - WPC - maltodextrina (20% p/v, relación 2:1:1) sin tratamiento térmico (a) y con tratamiento térmico (b). Tamaño y distribución de micropartículas obtenidas sin tratamiento térmico (■) y con tratamiento térmico (■).

La actividad de agua (a_w) indica la cantidad de agua libre en una muestra (no ligada química ni físicamente), es decir el agua de la muestra disponible para ser usada por los microorganismos u otros agentes destructivos. Junto con la presencia de oxígeno, son factores que afectan negativamente a la supervivencia de los probióticos durante el almacenamiento, influyendo tanto en el desarrollo bacteriano como en la reactividad química y enzimática de la matriz (Anal y Singh, 2007; Anekella y Orsat, 2014). El agua

residual es esencial en células deshidratadas para mantener la conformación de la proteína para su actividad enzimática, los lípidos de la pared celular, la estabilidad de la membrana estructural, ribosomas, etc. (Peighambardoust y col., 2011). Los polvos obtenidos en este ensayo, independientemente de la matriz utilizada, presentaron una a_w de 0,2 - 0,3 y se obtuvieron valores de humedad admisibles que oscilaron entre 3,6 y 5,2%.

El uso de carriers protectores y la exposición de las células a niveles moderados de estrés pueden ejercer sobre los microorganismos un efecto protector durante el secado spray y el almacenamiento (Prasad y col., 2003; Strasser y col., 2009). En este trabajo, se evaluó la aplicación de un tratamiento térmico (TT) en la matriz previo al secado spray, la supervivencia al secado y la conservación en el tiempo de *L. rhamnosus* 64 deshidratado en distintas matrices.

La supervivencia al proceso de secado de *L. rhamnosus* 64 (Fig. 50) fue diferente estadísticamente según la matriz de secado utilizada ($p < 0,05$) y solo en las matrices suero de queso – almidón y suero de queso – WPC – maltodextrina, el tratamiento térmico tuvo un efecto significativo (mayor muerte celular). Cuando se deshidrató en suero de queso – almidón – WPC, la muerte celular fue mayor (1,43 log UFC/mL) respecto a las otras matrices evaluadas: 0,38 y 0,72 log UFC/mL en suero de queso – almidón y suero de queso – WPC – maltodextrina, respectivamente. En estas últimas el tratamiento térmico tuvo un efecto negativo sobre la supervivencia al proceso de secado spray.

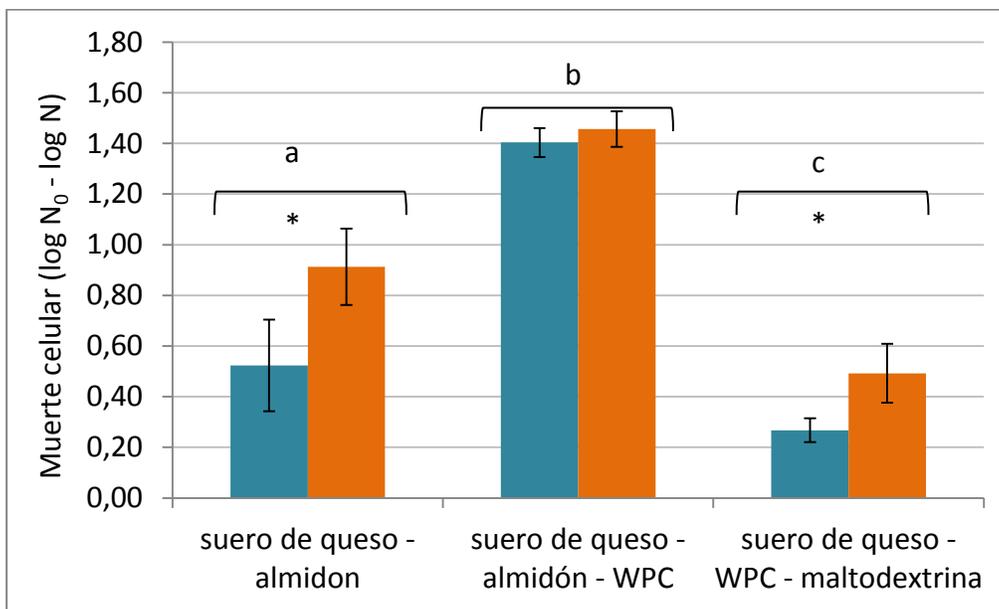


Figura 50: Muerte celular (diferencia de los logaritmos de UFC/mL antes y después del secado spray) de *L. rhamnosus* 64 secado spray en suero de queso combinado con almidón, WPC, o maltodextrina con la aplicación de un tratamiento térmico (■) o no (■) sobre la matriz de secado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las matrices ($p < 0,05$). * indica diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Luego del almacenamiento a corto plazo (45 días), prácticamente no se observaron pérdidas de la viabilidad celular cuando se deshidrató en suero de queso – almidón – WPC sin tratamiento térmico. Luego del almacenamiento durante 180 días (Fig. 51), la menor reducción en el número de células viables se observó para la matriz suero de queso – almidón – WPC sin tratamiento térmico ($2,01 \pm 0,26$ órdenes log UFC/g) mientras que cuando lo recibió la pérdida de viabilidad celular fue de $3,11 \pm 0,29$ log UFC/g. Esto confirma los resultados obtenidos en el punto 3.2 de este Capítulo donde se observó que la pérdida de viabilidad fue mayor (respecto a las muestras que no recibieron el tratamiento térmico y las que lo recibieron en el fermentador) cuando el tratamiento térmico se aplicó sobre la matriz de secado. Cuando *L. rhamnosus* 64 se deshidrató en suero de queso – almidón se observó una pérdida en la viabilidad celular del cultivo con

tratamiento térmico y sin tratamiento térmico de $2,22 \pm 0,17$ y de $2,58 \pm 0,14$ órdenes log UFC/g respectivamente, sin diferencias significativas. La reducción del nivel de células viables en suero de queso – WPC – maltodextrina con tratamiento térmico y sin tratamiento térmico fue de $2,98 \pm 0,21$ y $2,8 \pm 0,25$ y orden log UFC/g respectivamente.

Estos resultados permitieron seleccionar como las mejores opciones para la deshidratación de *L. rhamnosus* 64 a escala piloto, a las matrices suero de queso – almidón y suero de queso – WPC – maltodextrina (sin tratamiento térmico sobre la matriz de secado), donde se observaron pérdidas de viabilidad celular menores a medio orden logarítmico, y además debido a que durante la evaluación morfológica de las microcápsulas no se observaron partículas quebradas, tuvieron la mejor supervivencia al secado, aunque un comportamiento durante la conservación en el tiempo sobre el cual se debería trabajar aún para minimizar la pérdida de viabilidad.

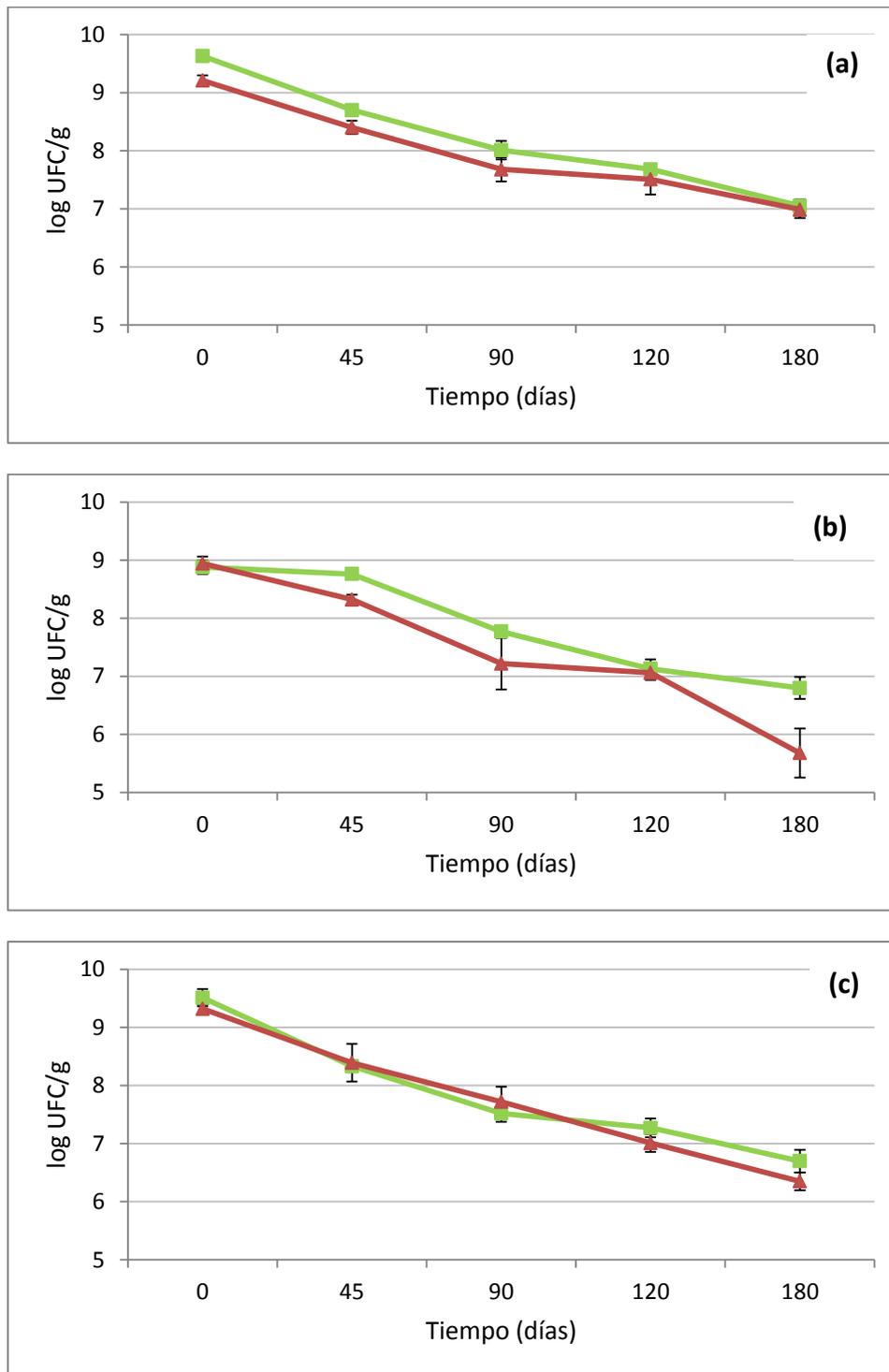


Figura 51: Viabilidad durante el almacenamiento a 5°C de *L. rhamnosus* 64 deshidratado a escala piloto en suero de queso - almidón 20% (a), suero de queso - almidón - WPC (b) y suero de queso - WPC - maltodextrina (c) con la aplicación de tratamiento térmico (▲) o no (■) sobre la matriz de secado.

Cabe aclarar que en esta parte del trabajo, la producción de biomasa se realizó en botellas de cultivo y a pH libre. La producción de biomasa en fermentador a pH 6 controlado tiene por objeto maximizar los niveles de células viables obtenidos ya que, al no descender el pH, no hay una inhibición de la actividad metabólica por acidez como sucede en general para el género *Lactobacillus* gradualmente a medida que desciende el pH. Por otro lado, la exposición natural a la acidez desarrollada durante el crecimiento de BAL, induce mayor tolerancia a factores de estrés posteriores (congelamiento, deshidratación, acidez gástrica). En este contexto, la producción de biomasa a pH libre en esta parte del trabajo, podría haber inducido mayor tolerancia al estrés que en los apartados anteriores, ya que a escala piloto, se observaron menos de 0,3 órdenes de reducción logarítmica de la viabilidad celular cuando la biomasa se deshidrató en suero de queso – WPC - maltodextrina. Aunque debido a que los ensayos se realizaron con diferentes equipos de secado spray, esto es sólo una hipótesis que requiere de nuevos diseños experimentales para su confirmación o rechazo.

3.4 Secado spray a escala industrial de *L. rhamnosus* 64.

Los resultados obtenidos a escala laboratorio no pueden generalizarse directamente a los procesos a escala piloto o industrial debido a las diferencias en los equipamientos utilizados y a los tiempos de los procesos, lo que resulta en variaciones considerables en los parámetros operativos (Fu y col., 1994; Fu y Chen, 2011). Mientras que el secado spray a escala laboratorio es un proceso discontinuo, donde la pérdida de material puede ser alta (baja tasa de recuperación), a mayores escalas este es un proceso continuo.

Se realizaron dos ensayos de secado spray a escala industrial explorando condiciones preliminares para evaluar el comportamiento de la cepa en estudio frente a diferentes condiciones de secado y matrices de encapsulación. En un primer ensayo se evaluó el efecto de la temperatura de salida. Se observó que, coincidiendo con lo publicado por Gardiner y col. (2000) y Ananta y col. (2005), a medida que aumentó la

temperatura de salida, aumentó la muerte celular en los cultivos deshidratados obtenidos (Fig. 52) y disminuyó el porcentaje de humedad (8 – 5,5%). La muerte celular a los 180 días (Fig. 53) fue mayor a 2 log UFC/g cuando la temperatura de salida fue mayor a 85°C.

En el segundo ensayo, se trabajó con una temperatura de entrada de 173°C y temperatura de salida 79°C y se evaluaron dos matrices (20% p/v de sólidos totales): suero de queso - almidón (1:1) y suero de queso - WPC - maltodextrina (2:1:1) (Fig. 54).

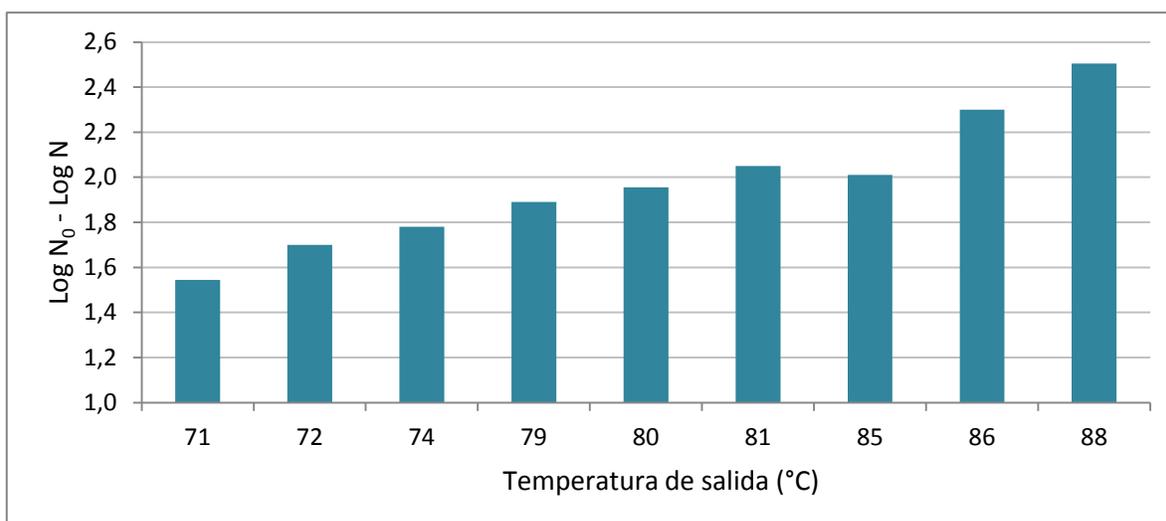


Figura 52: Efecto de la temperatura de salida sobre la inactivación celular al secado spray industrial de *L. rhamnosus* 64 en suero de queso - almidón (20% p/v, relación 1:1). Muerte celular: Log N₀ y N: recuento de células viables (log UFC/mL) antes y después del secado spray, respectivamente.

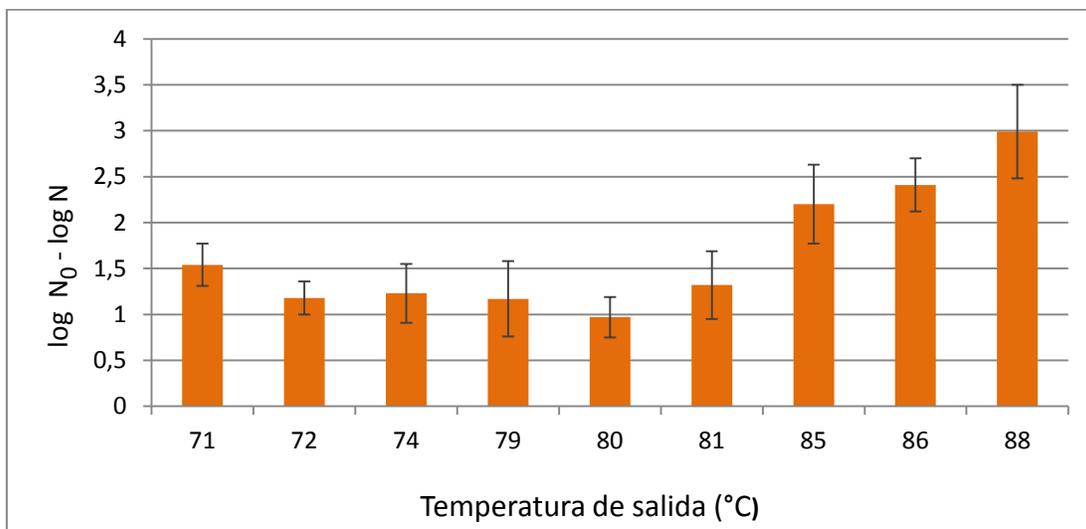


Figura 53: Efecto de la temperatura de salida sobre la supervivencia en el tiempo (180 días) de *L. rhamnosus* 64 secado spray a escala piloto en suero de queso - almidón (20% p/v, relación 1:1). Muerte celular: Log N₀ y N: recuento de células viables (Log UFC/g) a tiempo cero y a los 180 días de almacenamiento a 5°C, respectivamente.

Para este ensayo, la biomasa se produjo utilizando el medio de cultivo optimizado a pH constante, la misma recibió un tratamiento térmico moderado (45°C, 1h) en el fermentador y se resuspendió en dos matrices de secado: suero de queso – almidón (20% p/v, relación 1:1) y en suero de queso – WPC – maltodextrina (20% p/v, relación 2:1:1). Se evaluó la viabilidad post secado spray y luego de la conservación a 5°C (Fig. 54) de los polvos obtenidos y envasados al vacío, durante 180 días.

La muerte celular luego del secado spray fue de $2,129 \pm 0,27$ y $1,953 \pm 0,43$ para suero de queso – almidón y suero de queso – WPC – maltodextrina, respectivamente, sin diferencias significativas.

El comportamiento en el tiempo fue diferente según la matriz analizada. Esta diferencia estadísticamente significativa se manifestó a los 180 días ($p = 0,0142$), la matriz suero de queso – WPC – maltodextrina, ejerció un mayor poder protector durante el almacenamiento (muerte celular 1,46 log UFC/g) respecto a la matriz suero de queso – almidón (muerte celular 2,29 log UFC/g).

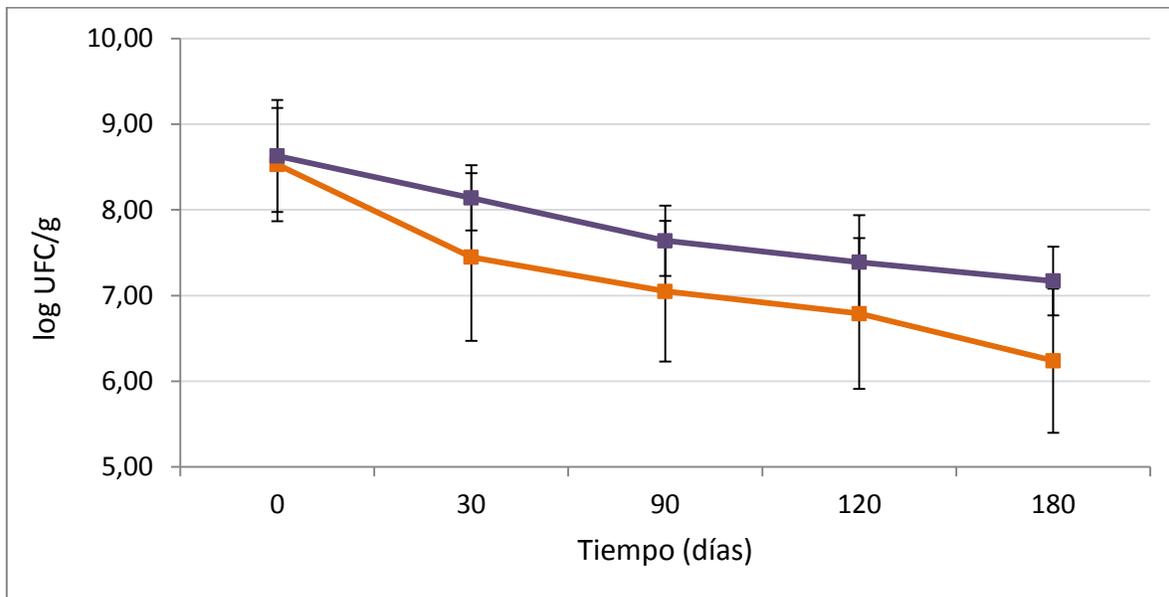


Figura 54: Sobrevida de *L. rhamnosus* 64 secado en un secadero spray industrial en suero de queso - almidón (■) y suero de queso - WPC - maltodextrina (■).

La viabilidad luego del secado spray en suero de queso – WPC – maltodextrina del cultivo producido a pH libre (y deshidratado en secadero spray piloto) fue mayor que en el cultivo producido a pH constante (y deshidratado en secadero spray industrial), lo que podría deberse a la inducción de resistencia a factores de estrés por el hecho de haber desarrollado la biomasa a pH libre, donde el microorganismo se expone naturalmente a la acidez que produce, pero debido al hecho de que se utilizaron equipos de secado diferentes, esta hipótesis no puede confirmarse en esta instancia.

4. CONCLUSIONES PARCIALES

La optimización del secado spray permitió conocer el efecto de las variables del proceso de secado spray sobre la supervivencia de la cepa en estudio, lo que facilitó realizar la deshidratación de los cultivos probióticos a escala piloto.

La aplicación del tratamiento térmico tuvo diferentes efectos según la etapa de producción a la cual se aplicó: sobre la biomasa directamente en el fermentador, sobre la solución de secado o en ambas etapas. Se observó una mayor protección durante el almacenamiento de los polvos cuando el estrés térmico moderado se aplicó directamente en el fermentador.

El uso de suero de queso combinado con otros ingredientes mejoró la viabilidad post secado y la supervivencia durante la conservación. Las mejores combinaciones fueron suero de queso – almidón y suero de queso – wpc – maltodextrina, esta última tuvo una mejor performance durante el proceso de secado y el almacenamiento.

CAPÍTULO IV-b: Adición de *L. rhamnosus* 64 deshidratado por secado spray a miniquesos reducidos en materia grasa.

1. INTRODUCCIÓN

Los productos lácteos fermentados son matrices alimentarias adecuadas para la incorporación de microorganismos probióticos, particularmente las leches fermentadas y los yogures son los productos más estudiados y aceptados por los consumidores. El queso fresco es un alimento versátil, adecuado para todos los grupos etarios y proporciona una valiosa alternativa como alimento probiótico. Tiene ventajas tecnológicas respecto a otros productos lácteos, ya que su estructura cohesiva, pH (cerca de 5) y contenido de grasa pueden ofrecer una protección adicional a las bacterias probióticas durante la vida de estante del producto y el paso por el tracto gastrointestinal.

El consumo de quesos ha aumentado en muchos países durante la última década (Cruz y col., 2009), lo cual proporciona una ventaja adicional para la adición de bacterias probióticas (Ranadheera y col. 2010). En Argentina el consumo de quesos es elevado (12 kg/año, MAGyP, 2012), si bien se encuentra por debajo de países de arraigada tradición quesera como Francia, Italia, Grecia y España, y de Estados Unidos, está muy por encima de economías de dimensión comparable, y supera notablemente a los demás países de Latinoamérica donde la incorporación de queso en la dieta es más reciente.

Durante el proceso de elaboración de quesos adicionados con bacterias probióticas, se puede producir una pérdida significativa de células viables en el suero de quesería (Ong y col., 2006) cuando se produce el corte de la cuajada y el desuerado. Una alternativa para evitar esta pérdida, es la aplicación de ultrafiltración de la leche como forma de aumentar los sólidos totales del producto. Esta tecnología se aplicó para la producción del primer queso probiótico comercial del país: Bioqueso Iloay Vita, desarrollado con cultivos probióticos comerciales de importación (Vinderola y col., 2000). Otra posible solución para minimizar el impacto económico de esta pérdida sería disponer de cultivos probióticos de bajo costo, lo que se traduciría en una ventaja económica para la producción de este tipo de quesos.

Los modelos experimentales que mejor reproducen las condiciones reales de elaboración y maduración son los quesos elaborados a escala de laboratorio. Los quesos miniatura o miniquesos pueden elaborarse bajo condiciones microbiológicas controladas

de una manera más sencilla que a escala piloto, y son reproducibles dado que la miniaturización permite lograr un mejor control del proceso (Shakeel-Ur-Rehman y col., 2001). Se han llevado a cabo numerosos estudios en miniquesos, con diferentes propósitos, entre ellos pueden citarse el modelo en miniatura para queso Cheddar (Shakeel-Ur-Rehman y col., 1998; Milesi y col., 2008), el queso de pasta lavada “Saint-Paulin” (Hynes y col., 2000), el Ch-easy[®] (Smit y col., 1995), queso Caciotta (Di Cagno y col., 2006), quesos de pasta blanda tipo Cremoso Argentino (Milesi, 2007) y los modelos MicroCheese y ScreenCheese (Engels y col., 2012), entre otros.

El recuento de cepas de bacterias probióticas no es un paso sencillo dentro del proceso de elaboración de productos fermentados con adición de este tipo de microorganismos, ya que deben diferenciarse de las cepas utilizadas como *starters* o cultivos iniciadores. Numerosos medios de cultivo han sido propuestos para este fin (Shah, 1997, Shah, 2000, Roy, 2001). Para la enumeración de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* en presencia de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, los medios de cultivo propuestos mostraron resultados variables (Dave y Shah, 1996). Vinderola y Reinheimer (2000) propusieron dos medios de cultivo: MRS-Bilis y MRS-LP para el recuento de bacterias probióticas, incluidas las cepas del grupo *L. casei*, en productos lácteos fermentados argentinos ya que ambos inhiben el crecimiento de los cultivos iniciadores.

OBJETIVO.

El objetivo de este capítulo fue evaluar la viabilidad de *L. rhamnosus* 64 en quesos blandos miniatura reducidos en grasa, adicionado como cultivo deshidratado por secado spray.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

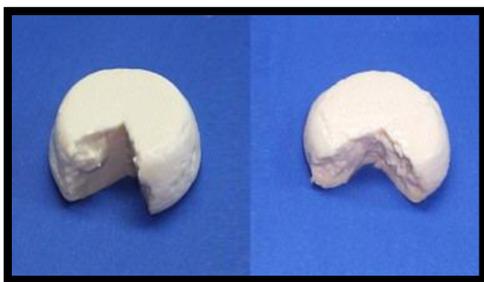
Se utilizó la tecnología de elaboración tradicional a escala laboratorio. En una primera etapa se llevó a cabo la producción de *L. rhamnosus* 64 deshidratado y luego se avanzó en la producción de queso blando (Figura 55).



Producción de biomasa de *L. rhamnosus* 64 en permeado de suero de queso formulado (Run 20).



Deshidratación por secado spray de *L. rhamnosus* 64 en suero de queso – almidón (20% p/v, relación 1:1).



Adición a miniquesos blandos reducidos en grasa.

Figura 55: Esquema de la adición de *L. rhamnosus* 64 a quesos miniatura reducidos en grasa.

2.1 Producción de *L. rhamnosus* 64 deshidratado en suero de queso - almidón.

Se obtuvo biomasa de *L. rhamnosus* 64 en un fermentador de 2 L (Sartorius Biostat A plus) inoculado (1% v/v) con un cultivo *overnight* (16 h, 37°C) obtenido en el medio de cultivo constituido por permeado de suero de quesería reconstituido (9% p/v) (Arla Foods, Porteña, Córdoba, Argentina) suplementado con 2,5 g/L de extracto de levadura, 2,5 g/L de triptona y 5 mL/L de solución Mg-Mn (MgSO₄ 2% p/v y MnSO₄ 0,4% p/v). La fermentación se realizó bajo condiciones de anaerobiosis con flujo de CO₂ (0,2 L/min, agitación 200 rpm), manteniéndose a pH 6 constante por adición automática de una solución estéril de Na₂CO₃ (211,96 g/L) / NaOH (160 g/L). La biomasa se concentró por centrifugación (6000 g, 10 min 5°C), se lavó dos veces con buffer PBS y el pellet se resuspendió en la solución de secado constituida por suero de queso – almidón (20% p/v, relación 1:1). Posteriormente se deshidrató en un secadero spray escala laboratorio Büchi B- 290. Las condiciones de secado fueron: temperatura de entrada: 130°C, temperatura de salida: 80°C, caudal de alimentación 15% (4,5 mL/min), flujo de aire: 40 mm (473 L/h).

2.2 Elaboración de quesos blandos miniatura reducidos en materia grasa.

Los quesos blandos miniatura reducidos en materia grasa se elaboraron en el Área de Procesos del Laboratorio de Calidad de Leche y Agroindustria del INTA EEA Rafaela. Se elaboraron dos tipos de quesos: 1) queso control, sin adición de probióticos; 2) queso con el agregado de *L. rhamnosus* 64 deshidratado por secado spray. Por cada tratamiento se hicieron elaboraciones por triplicado. Se realizaron recuentos microbiológicos en agar MRS – Bilis (en quesos adicionados de *L. rhamnosus* 64) y en agar PCA-leche (para recuento de microorganismos del *starter* totales en ambos quesos) a 0, 7, 14 y 30 días de almacenamiento a 5°C. Se efectuaron dos réplicas completas del ensayo en días diferentes, partiendo de leche cruda de similar calidad.

Se realizaron 6 elaboraciones individuales en tinas queseras de 1 L de capacidad. Para las elaboraciones se utilizó leche cruda (pH 6,65 ± 0,05 y acidez 18 ± 1°D) procedente del Tambo Experimental del INTA EEA Rafaela. En primer lugar, todo el volumen de leche

(40L) se estandarizó hasta una concentración de grasa de 1,9 g/100 mL por medio de una desnatadora (ELECTREM, Francia), y se pasteurizó a 65°C por 20 min. La leche estandarizada y pasteurizada se homogeneizó y distribuyó en las tinas. Una vez que la leche se enfrió hasta la temperatura de coagulación ($38,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$), se agregó 250 μL CaCl_2 (La Raiz S.A, Córdoba, Argentina) para alcanzar una concentración final en la leche de 0,02 % (p/v) y el fermento comercial liofilizado (La Raiz S.A, Córdoba, Argentina) de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* (10^6 UFC/mL de leche). En las elaboraciones correspondientes, el cultivo deshidratado de *L. rhamnosus* 64 de (10^{10} UFC/g) se agregó junto con el fermento para lograr una concentración inicial de 10^7 UFC/ml. Posteriormente a cada tina se le adicionó 90 μL de enzima coagulante (Quimosina ultra plus, 700 IMCU/mL, La Raiz S.A, Córdoba, Argentina). Se monitoreó el tiempo de coagulación, mediante un coagulómetro (INRA, PIGNAT, Francia). Una vez que el coágulo adquirió la firmeza adecuada se procedió al corte de la cuajada hasta alcanzar un tamaño de grano adecuado para este tipo de queso (Fig. 56). Posteriormente se agitó durante 1 min a 39°C para realizar un secado suave y se realizó la separación del suero y la cuajada, introduciendo esta última en un minimolde, el cual se colocó en una cámara a 37°C (etapa de acidificación). Se controló el pH hasta alcanzar 5,1 - 5,2. Los quesos miniatura se pesaron y salaron en salmuera (3 minutos) y previo al almacenamiento se envasaron al vacío utilizando una envasadora de mesada (Minimax 430, Rapivac, Argentina) en una bolsa microperforada (Cryovac, Buenos Aires, Argentina) adecuada para este tipo de quesos. Por último, los miniquesos se maduraron 20 días en cámara a 4°C. En la Figura 57 se presenta el esquema de elaboración descripto.



Figura 56: Coagulación y corte de cuajada en la elaboración de quesos miniatura.

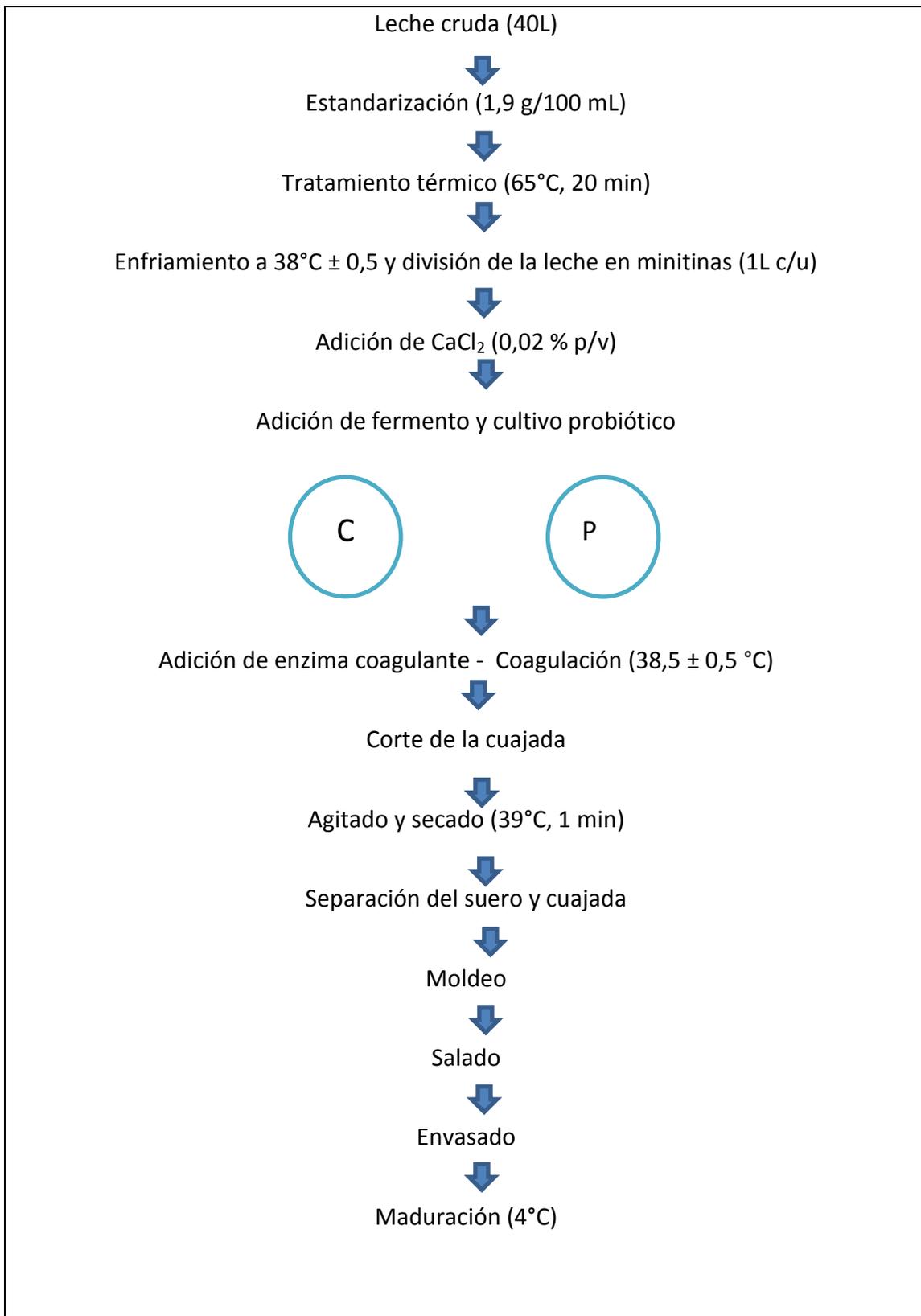


Figura 57: Esquema de elaboración de miniquesos controles (C) y probióticos (P).

2.3 Evaluación de la viabilidad de *L. rhamnosus* 64.

Para evaluar el desarrollo de *L. rhamnosus* 64 y del fermento en los quesos miniatura, se realizaron recuentos a tiempo 0, 7, 14 y 30 días. Se tomaron 5 g de queso y se emulsionaron con 45 mL de citrato de sodio estéril 2% (p/v) en stomacher, se realizaron las diluciones decimales sucesivas de esta suspensión en agua de peptona de caseína estéril 0,1% (p/v), y se sembraron en superficie 0,1 mL de cada una en el medio de cultivo correspondiente.

El recuento de *L. rhamnosus* 64 se realizó en MRS – Bilis, medio de cultivo selectivo utilizado para el recuento de lactobacilos probióticos, el cual consiste en agar MRS adicionado al 1,5% (v/v) de una solución de bilis bovina al 10% (p/v) (Vinderola y Reinheimer, 2000). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h. Se corroboró simultáneamente la ausencia de desarrollo microbiano en este medio de cultivo (inhibición del *starter*) de muestras de miniquesos control (sin adición de la cepa en estudio). El recuento de microorganismos totales del fermento (*L. lactis* y *S. thermophilus*) se realizó en el medio de cultivo APC-Leche con incubación a 37°C durante 48 h (Frank y col., 1993).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 - Elaboración de quesos blandos miniatura reducidos en materia grasa.

El pH (medido luego de la adición del fermento y del cultivo probiótico) y el tiempo de coagulación (TC) mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las leches controles y las leches adicionadas con *L. rhamnosus* 64. Estas últimas tuvieron un pH y un TC menor respecto a las leches que solo contenían el fermento (pH $6,46 \pm 0,02$ y TC $6,18 \pm 1,3$ min y pH $6,56 \pm 0,01$ y TC $8,5 \pm 0,3$ min, respectivamente). La disminución del TC observada luego de la adición del cultivo probiótico es consecuencia del menor pH de la leche (Nájera y col., 2003).

Al inicio de la acidificación, las cuajadas de los miniquesos con probióticos presentaron un pH levemente menor que las cuajadas controles, lo que podría ser una de la contribución de *L. rhamnosus* 64 en la fermentación. Sin embargo, todos los quesos alcanzaron el pH final (5,1-5,2) en el mismo tiempo (Fig. 58).

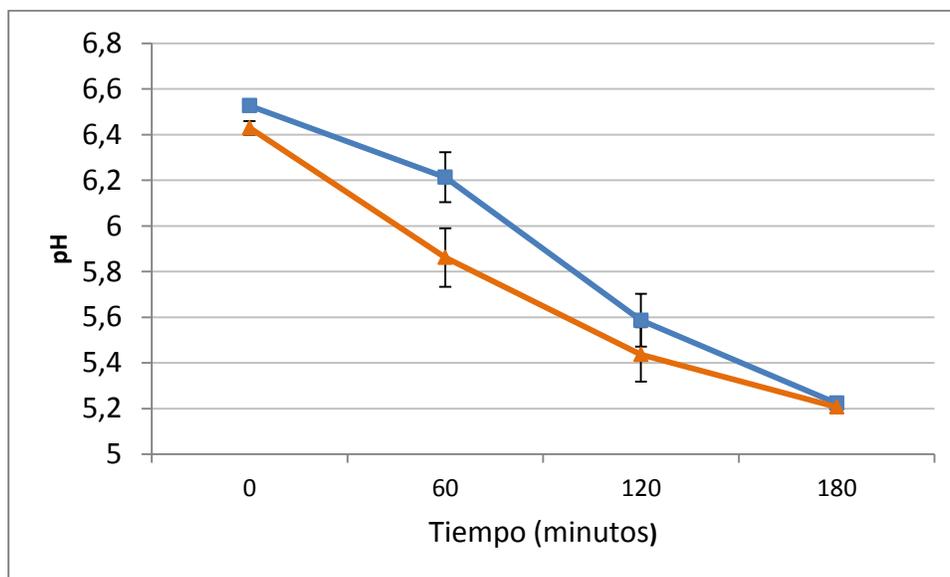


Figura 58: Cambios de pH durante la acidificación de los quesos control (■) y adicionados de *L. rhamnosus* 64 (▲) en los minimoldes.

Un comportamiento similar fue observado por Gardiner y col. (1999b), en quesos Cheddar elaborados a escala piloto utilizando como cultivo probiótico la cepa *E. faecium* PR88, la cual sobrevivió y contribuyó al desarrollo de ácido durante la fabricación del producto, aunque disminuyendo el tiempo necesario para alcanzar un pH de 5,3.

3.2 Evaluación de la viabilidad de *L. rhamnosus* 64.

En la Fig. 59 se presentan los resultados de los recuentos microbiológicos en los miniquesos controles y en aquellos adicionados con bacterias probióticas.

En los quesos control el desarrollo del fermento o *starter* fue similar al de una curva de crecimiento estándar, donde hay desarrollo del *starter* y luego se mantiene prácticamente constante durante la mayor parte del almacenamiento (Briggiler-Marco y col., 2007). En el caso del miniqueso adicionado de *L. rhamnosus* 64, a los 14 días de almacenamiento se observó un desarrollo de $1,73 \pm 0,4$ órdenes log UFC/g con respecto al tiempo inicial ($7,54 \pm 0,12$ log UFC/g) y a los 30 días se observó una disminución respecto al nivel de células viables a los 14 días ($9,27 \pm 0,44$ log UFC/g), registrándose un recuento de $7,99 \pm 0,24$ log UFC/g. Este comportamiento (desarrollo en la matriz del miniqueso durante la conservación y posterior reducción del nivel de células viables) podría ser la causa de la acidificación del miniqueso conteniendo la cepa probiótica observada durante el almacenamiento. En los miniquesos adicionados de *L. rhamnosus* 64, el pH inicial de 5,2 llegó a un valor de 4 hacia los 30 días de conservación a 5°C, observándose el fenómeno de desuerado del producto, mientras que en los quesos control no hubo desuerado y el pH llegó a 4,7. El grupo taxonómico de especies denominado *L. casei*, incluye a esta especie junto a *L. paracasei*, *L. rhamnosus* y *L. zeae* (Sato y col., 2012) y existen reportes sobre su capacidad de desarrollo aún a bajas temperaturas. Buriti y col. (2005) evaluaron la viabilidad de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC82 en un queso fresco Minas fabricado por acidificación directa con ácido láctico, observando que esta cepa aumentó 1,61 órdenes log UFC/g respecto al inóculo inicial hacia los 21 días de almacenamiento a 5 °C. Por otro lado, la capacidad de desarrollo de otra cepa de este grupo taxonómico, *L. casei* A13, a temperaturas de refrigeración en quesos frescos también se observó en el producto comercial Bioqueso ilolay Vita, lo cual impartió características sensoriales negativas (Vinderola y col., 2009).

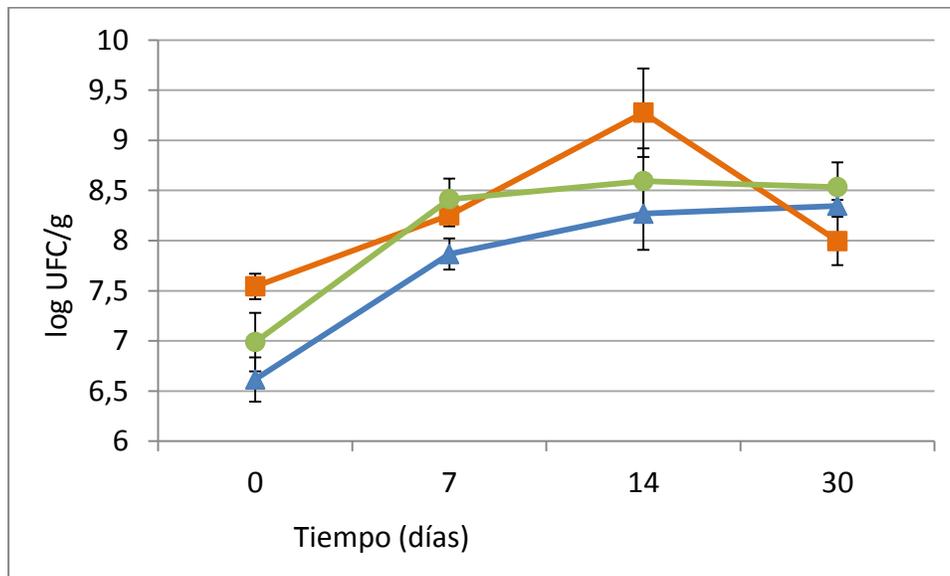


Figura 59: Recuento microbiológico total, durante la conservación a 5°C, de los microorganismos del fermento *starter* en quesos controles (▲) y en quesos probióticos (●) y recuento de *L. rhamnosus* 64 en el queso probiótico (■).

El desarrollo de *L. rhamnosus* 64 en la matriz del miniqueso durante la conservación refrigerada sugiere por un lado la incapacidad de la microcápsula de mantenerse como tal y aislar al microorganismo de la matriz láctea, debido a que en su constitución participan ingredientes solubles en agua (suero de queso y almidón). Por otro lado sugiere una elevada actividad de la cepa aún a temperaturas de refrigeración, por lo cual se deberían establecer nuevos estudios tendientes a identificar materiales insolubles a pH ácidos para formular las microcápsulas que lo contengan, que permitan mantener a la cepa aislada en ambientes ácidos, como por ejemplo productos lácteos fermentados y el ambiente estomacal, para ser liberada luego a nivel intestinal donde el pH es de neutro a alcalino (liberación controlada). En este contexto, los efectos protectores de los materiales utilizados en este estudio son limitados. Estas microcápsulas son solubles en medios acuosos y sólo tienen un efecto barrera durante el almacenamiento en seco, pero no en productos alimenticios líquidos y/o durante la digestión gastrointestinal (Heidebach y col., 2010).

4. CONCLUSIONES PARCIALES.

L. rhamnosus 64 fue capaz de mantener su viabilidad, y aún desarrollar, en el queso fresco seleccionado como alimento modelo, aunque su actividad metabólica impactó negativamente en las propiedades tecnológicas del producto (aumento de acidez y desuerado). La matriz de encapsulación seleccionada no fue efectiva para mantener aislado al cultivo en el producto, sin alterar las características físicoquímicas del producto debido a su desarrollo.

Para la incorporación de esta u otras cepas en quesos de forma realmente microencapsulada (aislada de la matriz alimentaria), se deberá avanzar en la selección y secado spray de ingredientes insolubles a pH ácidos o aquellos donde la liberación de las células del probiótico se produzca por acción, por ejemplo, de enzimas intestinales.

Conclusiones Finales.

El secado spray es una tecnología aun no utilizada a nivel industrial en el país para la producción de cultivos probióticos de uso en alimentos o farmacéutico, a pesar de contar con la capacidad instalada para hacerlo, lo que ofrece una oportunidad para el desarrollo de probióticos nacionales. La utilización de subproductos lácteos como suero de queso y permeado de suero de queso, ya sea como medio de cultivo o como matriz de secado, presenta nuevas posibilidades de uso contribuyendo de forma parcial a la problemática de su disposición final.

El presente trabajo de Tesis tuvo como objetivo obtener cultivos deshidratados por secado spray de bacterias probióticas autóctonas mediante el aprovechamiento de subproductos lácteos, y caracterizar, desde el punto de vista tecnológico y funcional, microorganismos de interés industrial para su aplicación en alimentos.

En primer lugar, se compararon microorganismos probióticos aislados de heces de neonatos santafesinos e identificados por métodos moleculares como *L. paracasei* Jp1, *L. rhamnosus* 64 y *L. gasseri* 37. Se observaron comportamientos diferenciales en cuanto al desarrollo en distintos medios de cultivo (formulados y lácteos) y en sus aptitudes tecnológicas (como la resistencia al secado spray y durante el almacenamiento). En particular *L. rhamnosus* 64 demostró ser una cepa robusta, capaz de desarrollar en medios de cultivo formulados y en medios lácteos, y con resistencia al secado spray en una solución de suero de queso - almidón con sobrevida satisfactoria.

Por medio de la suplementación de permeado de suero con extracto de levadura, triptona, Tween 80, Mg-Mn, se logró una adecuada producción de *L. rhamnosus* 64 en el fermentador. Se observó que la aplicación de un estrés térmico moderado previo al secado spray tuvo un efecto positivo sobre la viabilidad celular durante la conservación del cultivo deshidratado.

Respecto a los estudios funcionales, por medio de ensayos *in vivo* en distintos modelos experimentales, se demostró que *L. rhamnosus* 64 fue capaz de estimular la respuesta inmunitaria a nivel intestinal mediada por la IgA y en sitios distantes al intestino, como es la cavidad peritoneal, a través de la promoción de la actividad fagocítica de macrófagos residentes en este sitio anatómico. Por otro lado, el tratamiento tecnológico aplicado modificó la expresión de estos parámetros y de los perfiles de citoquinas. Frente a modelos murinos de patologías intestinales, en un ensayo de salmonelosis, la cepa en estudio no tuvo un efecto como cultivo secado spray sobre la mortalidad, pero la administración oral de *L. rhamnosus* 64 como cultivo secado spray, produjo un efecto protector frente a la colitis inducida por TNBS.

Finalmente se estudió la aplicación de secado spray escala piloto como método de conservación de bacterias probióticas, evaluándose viabilidad, aspectos morfológicos y tecnológicos del cultivo probiótico en polvo obtenido. Se aplicó un pretratamiento térmico subletal en el fermentador, previo al secado spray para incrementar la resistencia térmica intrínseca de la cepa y mejorar la conservación durante el almacenamiento de los probióticos deshidratados en diferentes matrices. La estabilidad de los cultivos deshidratados, la supervivencia al secado spray y la estabilidad durante el almacenamiento fue dependiente de la matriz de secado utilizada, tanto suero de queso – almidón como suero de queso – WPC –maltodextrina, demostraron ser matrices adecuadas para la producción de probióticos deshidratados, pero ni la tecnología ni la matriz seleccionada fueron eficientes para poder adicionar *L. rhamnosus* 64 en un queso fresco sin modificar las características organolépticas del mismo.

En su conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis demuestran que *L. rhamnosus* 64 posee el potencial tecnológico y funcional para ser considerada una cepa probiótica y avanzar así con la producción de cultivos probióticos autóctonos deshidratados por secado spray a gran escala para su utilización en la producción de alimentos funcionales.

Perspectivas.

En la presente Tesis Doctoral se avanzó en el conocimiento sobre el potencial de lactobacilos autóctonos y del secado spray para ser utilizados en la industria de alimentos funcionales. Se analizaron aspectos tecnológicos y funcionales, y se obtuvieron resultados alentadores para la cepa *L. rhamnosus* 64. Las temáticas sobre las cuales se pretende avanzar a través de un trabajo posdoctoral son:

- 1) El escalado industrial de la producción de biomasa de la cepa en medios de cultivo económicamente factibles y en fermentadores de escala industrial.
- 2) La formulación de los polvos para lograr una mejor dispersabilidad y solubilidad.
- 3) La profundización de los estudios de producción de biomasa deshidratada y de estabilidad durante el almacenamiento, mediante la aplicación de otras tecnologías o materiales de microencapsulación que permitan mayor viabilidad a largo plazo y mantener verdaderamente aislada a la cepa aún en medios acuosos a pH ácidos (productos lácteos fermentados y ambiente estomacal) y permitir su liberación controlada a nivel intestinal por cambios de pH o por acción de enzimas intestinales.

Bibliografía.

Aguirre-Ezkauriatza, E.J.; Aguilar-Yáñez, J.M.; Ramírez-Medrano, A.; y Alvarez, M.M. (2010) *Production of probiotic biomass (Lactobacillus casei) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures*. Bioresour. Technol. 101: 2837-2844.

Ananta E.; Volkert M. y Knorr, D. (2005) *Cellular injuries and storage stability of spray-dried Lactobacillus rhamnosus GG*. Int. Dairy J. 15: 399-409.

Anekella, K. y Orsat, V. (2014) *Shelf life stability of lactobacilli encapsulated in raspberry powder: insights into non-dairy probiotics*. Int. J. Food Sci. Nutr. 65(4): 411-418.

A.O.A.C. (1995) *Ash of milk - gravimetric method*. En: Official Methods of A.O.A.C. International, method 945.46 (33.2.10).

APHA. (1998) *Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater*, 20° edición. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC, Estados Unidos.

Arslan, S.; Erbas, M.; Tontula, I. y Topuz A. (2015) *Microencapsulation of probiotic Saccharomyces cerevisiae var. boulardii with different wall materials by spray drying*. LWT - Food Sci. Technol. 63: 685-690.

Aschenbrenner, M.; Kulozik, U. y Foerst, P. (2012) *Evaluation of the relevance of the glassy state as stability criterion for freeze-dried bacteria by application of the Arrhenius and WLF model q*. Cryobiol. 65: 308-318.

Aureli, P.; Capurso, L.; Castellazzi, A.M.; Clerici, M.; Giovannini, M.; Morelli, L.; Poli, A.; Pregliasco, F.; Salvini, F. y Zuccotti, G.V. (2011) *Probiotics and health: an evidence-based review*. Pharmacol. Res. 63(5): 366-376.

Baranyi, J. y Le Marc, Y. (1996) *Dmfit Manual, Version 2.0*. Institute of Food Research, Norwich, Reino Unido.

Baranyi, J. y Roberts, T.A. (1994) *A dynamic approach to predicting bacterial growth in food*. Int. J. Food Microbiol. 23: 277-294.

Barbosa-Canovas, G.V.; Ortega-Rivas, E.; Juliano, P. y Yan, H. (2005) *Food Powders: Physical Properties, Processing and Functionality*. Kluwer Academic: Nueva York.

Boza, Y.; Barbin, D. y Scamparini, A.R.P. (2004) *Survival of Beijerinckia sp. Microencapsulated in carbohydrates by spray-drying*. J. Microencapsulation. 21:15-24.

BCC Research (2014) *The Probiotics Market: Ingredients, Supplements, Foods*. <http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/probiotics-market-fod035d.html>

Buitink, J.; Van den Dries, I.J.; Hoekstra, F.A.; Alberda, M. y Hemminga, M.A. (2000) *High critical temperature above T_g may contribute to the stability of biological systems*. Biophys. J. 79: 1119-1128.

Bunning, V.K.; Crawford, R.G.; Tierney, J.T. y Peeler, J.T. (1990) *Thermotolerance of Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium after sublethal heat shock*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3216-3219.

Bruno-Bárcena, J.M.; Azcárate-Peril, M.A.; Hassan, H.M. (2010) *Role of antioxidant enzymes in bacterial resistance to organic acids*. Appl. Environ. Microbiol. 76(9): 2747-2753.

Brusch Brinques, G.; Do Carmo Peralba, M. y Záchia Ayub, M.A. (2010) *Optimization of probiotic and lactic acid production by Lactobacillus plantarum in submerged bioreactor systems*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 37: 205-212.

Burgain, J.; Gaiani, C. Linder, M. y Scher, J. (2011) *Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications*. J. Food Eng. 104(4): 467-483.

Burns, P.; Molinari, F., Vinderola, G. y Reinheimer, J. (2008) *Suitability of whey and buttermilk for the production and frozen storage of cultures of probiotic lactobacilli*. Int. J. Dairy Technol. 61: 156-164.

Burns, P.; Molinari, F.; Beccaria, A.; Páez, R.; Meinardi, C.; Reinheimer, J. y Vinderola G. (2010) *Suitability of buttermilk for fermentation with Lactobacillus helveticus and*

production of a functional peptide-enriched powder by spray-drying. J. Appl. Microbiol. 109: 1370-1378.

Bylund G. (1995) *Fairy Processing Handbook*, Tetra Pak Processing System AB, Suecia.

Cerutti A. y Rescigno M. (2008) The Biology of Intestinal Immunoglobulin A responses. Immun. 28 (6): 740-750.

Cal, K. y Sollohub, K. (2010). *Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology.* J. Pharmaceutical Sci. 99: 587-597.

Cano-Chauca, M.; Stringheta, P.C.; Ramos, A.M. y Cal-Vidal, J. (2005) *Effect of carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization.* Innov. Food Sci. Emerg. Tech. 6: 420–428.

Carvalho, A.S.; Silva, J.; Hob, P.; Teixeira, P.; Malcata, F.X. y Gibbs, P. (2004) *Review. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria.* Int. Dairy J. 14: 835-847.

Castillo, N.A.; Perdigón, G. y de LeBlanc, A. (2011) *Oral administration of a probiotic lactobacillus modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in mice.* BMC Microbiol. 11: 177.

Champagne, C.P. ; Roy, D. y Lafond, A. (1997) *Selective enumeration of Lactobacillus casei in yoghurt-type fermented milks based on a 15°C incubation temperature.* Biotechnol. Tech. 11: 567-569.

Champagne, C.P.; Roy, D. y Gardner, N. (2005) *Challenges in the addition of probiotic cultures to foods.* Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45: 61-84.

Chávez, B.E. y Ledebøer, A.M. (2007) *Drying of Probiotics: Optimization of Formulation and Process to Enhance Storage Survival.* Drying Technol. 25 (7-8): 1193-1201.

Chávez-Tapia, N.C.; Gonzales-Rodriguez, L.; Jeong, M.; Lopes-Ramirez, Y.; Barbero - Becerra, V.; Juárez-Hernández, E.; Romero-Flores, J.; Arrese, M.; Mendez-Sanchez, N. y

Uribea, M. (2015) *Current evidence on the use of probiotics in liver diseases*. J. Funct. Foods. 17: 137-151.

Chiba, Y.; Shida, K.; Nagata, S.; Wada, M.; Bian, L.; Wang, C.; Shimizu, T.; Yamashiro, Y.; Kiyoshima-Shibata, J.; Nanno, M. y Nomoto, K. (2010) *Well-controlled proinflammatory cytokine responses of Peyer's patch cells to probiotic Lactobacillus casei*. Immunol. 130(3): 352-362.

Christopherson, A.T. y Zottola, E.A. (1989) *Whey Permeate as a Medium for Mesophilic Lactic Acid Streptococci*. J. Dairy Sci. 72: 1701-1706.

Claes, I.J.; De Keersmaecker, S.C.; Vanderleyden, J. y Lebeer, S. (2011). *Lessons from probiotic-host interaction studies in murine models of experimental colitis*. Mol. Nutr. Food Res. 55(10): 1441-1453.

Collado, M.C.; Isolauri, E.; Laitinen, K. y Salminen, S. (2010) *Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy*. Am. J. Clin. Nutr. 92(5): 1023-1030.

Corcoran, B.M.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F. y Stanton, C. (2004) *Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances*. J. Appl. Microbiol. 96: 1024-1039.

Corcoran, B.M.; Stanton, C.; Fitzgerald, G. y Ross, R.P. (2008) *Life under stress: The probiotic stress response and how it may be manipulated*. Curr. Pharm. Des. 14: 1382-1399.

Crittenden, R.; Laitila, A.; Forssell, P.; Mättö, J.; Saarela, M.; Mattila-Sandholm, T. y Myllärinen, P. (2001) *Adhesion of bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies*. Appl. Environ. Microbiol. 67(8): 3469-3475.

Curda, L.; Rudolfova, J.; Stetina, J. y Dryak, B. (2006) *Dried buttermilk containing galactooligosaccharides - process layout and its verification*. J. Food Eng. 77: 468-471.

Cruz, A.G.; Antunes, A.E.C.; Sousa, A.L.O.P.; Faria, J.A.F. y Saad S.M.I. (2009). *Ice cream as a probiotic food carrier*. Food Res. Int. 42: 1233-1239.

Dave, R.I. y Shah, N.P. (1998) *Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt*. J. Dairy Sci. 81(11): 2804-2816.

De Castro Cislighi, F.P.; Dos Reis, E.; Silva, C.; Fritzen Freire, C.B.; Goulart Lorenz, J. y Sant'Anna, E. (2012) *Bifidobacterium Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage*. J. Food Eng. 113: 186-193.

De Jong, H.K.; Parry, C.M.; van der Pol, I.T. y Wiersinga, W.J. (2012) *Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis*. PLoS Pathog. 8(10): e1002933.

de Kivit, S.; Saeland, E.; Kraneveld, A.D.; van de Kant, H.J.; Schouten, B.; van Esch, B.C.; Knol, J.; Sprikkelman, A.B.; van der Aa, L.B, Knippels, L.M.; Garssen, J.; van Kooyk, Y. y Willemsen, L.E. (2012) *Galectin-9 induced by dietary synbiotics is involved in suppression of allergic symptoms in mice and humans*. Allergy 67(3): 343-352.

de Moreno de LeBlanc, A.; Castillo, N.A. y Perdígón, G. (2010) *Anti-infective mechanisms induced by a probiotic Lactobacillus strain against Salmonella enterica serovar Typhimurium infection*. Int. J. Food Microbiol. 138(3): 223-231.

de Moreno de LeBlanc, A.; Chaves, S.; Carmuega, E.; Weill, R.; Antóine, J. y Perdígón, G. (2008) *Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages*. Immunobiol. 213(2): 97-108.

De Preter V.; Hamer H.M.; Windey K. y Verbeke K. (2011) *The impact of pre - and/or probiotics on human colonic metabolism: Does its affect human health?* Mol. Nutr. Food Res. 55: 46-57.

Desjardins, P.; Meghrou, J. y Lacroix, C. (2001) *Effect of aeration and dilution rate on nisin Z production during continuous fermentation with free and immobilized Lactococcus lactis UL719 in supplemented whey permeate*. Int. Dairy J. 11: 943-951.

Desmond, C.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.F.; Collins, K. y Ross, R.P.(2001) *Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying*. Int. Dairy J. 11: 801–808.

Desmond, C.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.F.; Collins, K. y Ross, R.P. (2002) *Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying*. Int. Dairy J. 12: 183-190.

Desmond, C.; Fitzgerald, G.F.; Stanton, C. y Ross, R.P. (2004) *Improved stress tolerance of GroESL-overproducing Lactococcus lactis and probiotic Lactobacillus paracasei NFBC 338*. Appl. Environ. Microbiol. 70(10): 5929-5936.

De Vos, P.; Faas, M.M.; Spasojevic. M. y Sikkema, J. (2010) *Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components*. Int. Dairy J. 20(4): 292-302.

Doherty, S.B.; Gee, V.L.; Ross, R.P.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.F. y Brodkorb, A. (2011) *Development and characterization of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection*. Food Hydrocolloids, 25: 1604-1617.

Dong, Z.; Gu, J.; Zhang, M.; Wang, G.; Du, J.; Chen, J. y Li, H. (2014) *Optimisation for high cell density cultivation of Lactobacillus salivarius BBE 09-18 with response surface methodology*. Int. Dairy J. 34: 230-236.

Duboc, H.; Rajca, S.; Rainteau, D.; Benarous, D.; Maubert, M.A.; Quervain, E.; Thomas, G.; Barbu, V.; Humbert, L.; Despras, G.; Bridonneau, C.; Dumetz, F.; Grill, J.P.; Masliah, J.; Beaugerie, L.; Cosnes, J.; Chazouillères, O.; Poupon, R.; Wolf, C.; Mallet, J.M.; Langella, P.; Trugnan, G.; Sokol, H. y Seksik, P. (2013) *Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases*. Gut 62(4): 531-539.

Fajardo Bernárdez, P.; Amado, R.I.; Pastrana, L. y Guerra, N.P. (2008) *Production of a potentially probiotic culture of Lactobacillus casei subsp. Casei CECT 4043 in whey*. Int. Dairy J. 18: 1057-1065.

FAO/WHO. (2002) *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio_en.stm.

Fávaro-Trindade, C.S. y Grosso C.R.F. (2002) *Microencapsulation of L. acidophilus (La-05) and B. Lactis (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile*. *J. Microencapsulation* 19(4): 485-494.

Feng T. y Elson C.O. (2011) *Adaptive immunity in the host-microbiota dialog*. *Mucosal Immunol.* 4: 15-21.

FIL - IDF. (1993) *Dried Milk and Dried Cream. Determination of Water Content*. International Dairy Federation Standard 26A. Bruselas, Bélgica: International Dairy Federation.

Fink, L.N.; Zeuthen, L.H.; Ferlazzo, G. y Frøkiaer, H. (2007) *Human antigen-presenting cells respond differently to gut-derived probiotic bacteria but mediate similar strain-dependent NK and T cell activation*. *FEMS - Immunol. Med. Microbiol.* 51(3): 535-546.

Finney, J.; Buffo, R. y Reineccius, G.A. (2002) *Effects of type of atomization and processing temperatures on the physical properties and stability of spray-dried flavors*. *J. Food Sci.* 67(3): 1108-1114.

Fitzpatrick, J.J.; y O'Keefe, U. (2001) *Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid*. *Process Biochem.* 37: 183-186.

Floch, M.H. (2014) *Recommendations for probiotic use in humans: a 2014 update*. *Pharmaceuticals.* 7(10): 999-1007.

Foligné, B.; Parayre, S.; Cheddani, R.; Famelart, M.H.; Madec, M.N.; Plé, C.; Breton, J.; Dewulf, J.; Jan, G. y Deutsch, S.M. (2016) *Immunomodulation properties of multi-species fermented milks*. *Food Microbiol.* 53(Pt A): 60-69.

Foligné, B.; Daniel, C. y Pot, B. (2013) *Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges*. *Curr. Opin. Microbiol.* 16: 284-292.

Foligné, B.; Deutsch, S.M.; Breton, J.; Cousin, F.J.; Dewulf, J.; Samson, M.; Pot, B. y Jan, G. (2010) *Promising immunomodulatory effects of selected strains of dairy propionibacteria as evidenced in vitro and in vivo*. Appl. Environ. Microbiol. 76(24): 8259-8264.

Foligné, B.; Nutten, S.; Grangette, C.; Dennin, V.; Goudercourt, D.; Poiret, S.; Dewulf, J.; Brassart, D.; Mercenier, A. y Pot B. (2007) *Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria*. World J. Gastroenterol. 13(2): 236-243.

Foligné, B.; Nutten, S.; Steidler, L.; Dennin, V.; Goudercourt, D.; Mercenier, A. y Pot, B. (2006) *Recommendations for improved use of the murine TNBS-induced colitis model in evaluating anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria: technical and microbiological aspects*. Dig. Dis. Sci. 51(2): 390-400.

Frank, J.F.; Christen, G.L. y Bullerman, L.B. (1993) *Cap. 8: Tests for groups of microorganisms*. En: Standard methods for the examination of dairy products (Ed.: Marshall, R.) American Public Health Association (APHA), Washington, Estados Unidos. p. 271-286.

Fritzen-Freire, C.B.; Prudencio, E.; Amboni, R.; Pinto, S.; Negrao-Murakami, A.N. y Murakami, F.S. (2012) *Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics*. Food Res. Int. 45(1): 306-312.

Fu, N. y Chen, X.D. (2011) *Towards a maximal cell survival in convective thermal drying process*. Food Res. Int. 44: 1127-1249.

Galdeano, C.M.; y Perdigón, G. (2004) *Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation*. J. Appl. Microbiol. 97: 673-81.

Gardiner, G.E.; Bouchier, P.; O'Sullivan, E.; Kelly, J.; Collins, J.K.; Fitzgerald, G.; Ross, R.P. y Stanton C. (2002) *A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture*. Int. Dairy J. 12: 749-756.

Gardiner, G.E.; O'Sullivan, E.; Kelly, J.; Auty, M.A.; Fitzgerald, G.F.; Collins, J.K.; Ross, R.P. y Stanton, C. (2000) *Comparative survival rates of human-derived probiotic Lactobacillus paracasei and L. salivarius strains during heat treatment and spray drying*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2605-2612.

Gharsallaoui, A. ; Roudaut, G. ; Chambin, O. ; Voilley, A. y Saurel, R. (2007) *Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview*. Food Res. Int. 40: 1107 -1121.

Gill, H.S.; Shu, Q.; Lin, H.; Rutherford, K.J. y Cross, M.L. (2001) *Protection against translocating Salmonella typhimurium infection in mice by feeding the immuno-enhancing probiotic Lactobacillus rhamnosus HN001*. Med. Microbiol. Immunol. 190: 97-104.

Goderska, K. y Czarnecki, Z. (2008) *Influence of microencapsulation and spray drying on the viability of Lactobacillus and Bifidobacterium strains*. Pol. J. Microbiol. 57(2): 135-140.

Golowczyc M.; Silva J.; Abraham A.; De Antoni G. y Teixeira, P. (2010) *Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray-drying*. Lett. Appl. Microbiol. 50: 7-12.

Golowczyc, M.; Silva, J.; Teixeira, P.; De Antoni, G. y Abraham, A. (2011) *Cellular injuries of spray-dried Lactobacillus spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties*. Int. J. Food Microbiol. 144 (3): 556-560.

Gregoret, V.; Perezlindo, M.J.; Vinderola, G.; Reinheimer, J. y Binetti, A.A. (2013) *A comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived Lactobacillus for industrial use*. Food Microbiol. 34: 19-28.

Gueimonde, M. y Sánchez, B. (2012) *Enhancing probiotic stability in industrial processes*. Microb. Ecol. Health Dis. Doi:10.3402/mehd.v23i0.18562.

Guerra, N.P. y L. Pastrana. (2002) *Nisin and pediocin production on mussel-processing waste supplemented with glucose and five nitrogen sources*. Lett. Appl. Microbiol. 34: 114-118.

Guilbaud, M.; Zagorec, M.; Chaillou, S. y Champomier-Vergès, M. (2012) *Intraspecies diversity of Lactobacillus sakei response to oxidative stress and variability of strain performance in mixed strains challenges*. Food Microbiol. 29: 197-204.

Hansen J.; Gulati A. y Sartor R.B. (2010) *The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria*. Curr. Opin. Gastroenterol. 26: 564-71.

Heithoff, D.M.; Shimp, W.R.; House, J.K.; Xie, Y.; Weimer, B.C.; Sinsheimer, R.L. y Mahan, M.J. (2012) *Intraspecies variation in the emergence of hyperinfectious bacterial strains in nature*. PLoS Pathogens. 8(4):e1002647.

Hickson, M.; D'Souza, A.L.; Muthu, N.; Rogers, T.R.; Want, S.; Rajkumar, C. y Bulpitt, C.J. (2007) *Use of probiotic Lactobacillus preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial*. BMJ. 335(7610):80.

Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; Calder, P.C. y Sanders. M.E. (2014) *Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic*. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 11(8): 506-514.

Hugo A.; Bruno, F.; Golowczyc, M.(2016) *Whey permeate containing galacto-oligosaccharides as a medium for biomass production and spray drying of Lactobacillus plantarum CIDCA 83114*, LWT - Food Sci. Technol. 69, 185-190.

Hurley, D.; McCusker, M.P.; Fanning, S. y Martins, M. (2014) *Salmonella-host interactions: modulation of the host innate immune system*. Front. Immunol. 5: 481.

Heidebach, T.; Först, P. y Kulozik, U. (2010) *Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells*. J. Food Eng. 98(3): 309-316.

Heidebach, T.; Leeb, E.; Först, P. y Kulozik, U. (2011) *Microencapsulation of Probiotic Cells. Colloids in Biotechnology*. Ed.: Fanun, M. CRC Press, Boca Raton, FL, Estados Unidos, p. 293–312.

Holscher, H.D.; Czerkies, L.A.; Cekola, P.; Litov, R.; Benbow, M.; Santema, S.; Alexander, D.D.; Perez, V.; Sun, S.; Saavedra, J.M y Tappenden, K.A. (2012) *Bifidobacterium lactis Bb12 enhances intestinal antibody response in formula-fed infants: a randomized, double-blind, controlled trial*. J. Parenteral and Enteral Nutrition. 36 (1 Suppl): 106S -117S.

Iaconelli C.; Lemetais G.; Kechaou N.; Chain F. y Bermudez-Humaran L.G. (2015) *Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities*. J. Biotechnol. 214: 17-26.

IDF. (1987a) *Determination of the Fat Content of Skim Milk, Whey and Buttermilk by the Rose-Gottlieb Gravimetric Method (reference method)*. Bruselas, Bélgica: IDF (FIL-IDF Standard 22B).

IDF. (1987b) *Milk, Cream and Evaporated milk - Dry Matter Oven Method (reference method)*. Bruselas, Bélgica: IDF (FIL-IDF Standard 21B).

IDF. (1993) *Dried milk and dried cream. Determination of water content*. Bruselas, Bélgica: IDF (FIL-IDF Standard 26 A).

IDF. (2001) *Milk - Determination of Nitrogen Content - Part 1: Kjeldahl Method*. Bruselas, Bélgica: IDF (FIL-IDF Standard 20-2 ISO 8968-2).

Jantzen, M.; Göpel, A. y Beermann, C. (2013) *Direct spray drying and microencapsulation of probiotic Lactobacillus reuteri from slurry fermentation with whey*. J. Appl. Microbiol. 115: 1029-1036.

Johansson, M.A.; Saghafian-Hedengren, S.; Haileselassie, Y.; Roos, S.; Troye-Blomberg, M.; Nilsson, C. y Sverremark-Ekström, E. (2012) *Early-life gut bacteria associate with IL-4-, IL-10- and IFN- γ production at two years of age*. PLoS One. 7(11):e49315.

Jones, J.R.; Prime, D. y Leaper, M.C. (2013) *Effect of processing variables and bulk composition on the surface composition of spray dried powders of a model food system*. J. Food Eng. 118(1): 19-30.

Kabeerdoss, J.; Devi, R.S.; Mary, R.R.; Prabhavathi, D.; Vidya, R.; Mechenro, J.; Mahendri, N.V.; Pugazhendhi, S. y Ramakrishna, B.S. (2011) *Effect of yoghurt containing Bifidobacterium lactis Bb12[®] on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy dult volunteers*. Nutrition J. 10: 138.

Khem, S.; Woo, M.W.; Small, D.M.; Chen, X.D. y May, B.K. (2015) *Agent selection and protective effects during single droplet drying of bacteria*. Food Chem. 166: 206-214.

Knorr, D. (1998) Technological aspects related to microorganisms in functional foods. Trends Food Sci. Technol. 9: 295-306.

Korbekandi, H; Mortazavian, A.M. y Iravani, S. *Technology and stability of probiotic in fermented milks*. En: Shah, N.P. *Probiotic and prebiotic foods: technology, stability and benefits to the human health*. 121–146. USA: Nova Science Publishing Ltd.

Lacroix, C. y Yidirim, S. (2007) *Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality*. Curr. Opin. Biotechnol. 18: 176-183.

Lahtinen, S.J. (2012) *'Probiotic viability - does it matter?'* Microb. Ecol. Health Dis. 23: 18567.

Lamm, M.E. y Phillips-Quagliata, J.M. (2002) *Origin and homing of intestinal IgA antibody-secreting cells*. J. Exp. Med. 195(2): F5-8.

Lapaque, N.; Walzer, T.; Méresse, S.; Vivier, E. y Trowsdale, J.(2009) *Interactions between human NK cells and macrophages in response to Salmonella infection*. J. Immunol. 182(7): 4339-4348.

Lavari, L.; Páez, R.; Cuatrin, A.; Reinheimer, J. y Vinderola, G. (2014) *Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli*. J. Dairy Res. 81: 267-274.

Lian, W.C.; Hsiao, H.C. y Chou, C.C. (2002) *Survival of bifidobacteria after spray-drying*. Int. J. Food Microbiol. 74: 79-86.

Lima-Filho, J.V.; Vieira, L.Q.; Arantes, R.M. y Nicoli, J.R. (2004) *Effect of the Escherichia coli EMO strain on experimental infection by Salmonella enterica serovar Typhimurium in gnotobiotic mice*. Braz. J. Med. Biol. Res. 37(7): 1005-1013.

Liu, S. (2003) *Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations*. Int. J. Food Microbiol. 83, 115-131.

Macedo, M.G.; Lacroix, C.; Gardner, N.J. y Champagne, C.P. (2002) *Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by Lactobacillus rhamnosus RW-9595M in whey permeate*. Int. Dairy J. 12: 419-426.

Macpherson, A.J.; Geuking, M.B.; Slack Siegfried, E.; Hapfelmeier, K. y McCoy, D. (2012) *The habitat, double life, citizenship, and forgetfulness of IgA*. Immunol. Rev. 245: 132-146.

MAGyP (2012) Ministerio de Agroindustria.
http://www.agroindustria.gov.ar/site/subsecretaria_de_lecheria/lecheria/03-estadisticas/04_interno/archivos/MI002.php

Maia, O.B.; Duarte, R.; Silva, A.M.; Cara, D.C. y Nicoli, J.R. (2001) *Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with Salmonella enterica subsp. enterica ser. Typhimurium*. Vet. Microbiol. 79(2): 183-189.

Makinen, K.; Berger, B.; Bel-Rhliid, R. y Ananta, E. (2012) *Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products*. J. Biotechnol. 162(4): 356-365.

Malaguarnera, G.; Leggio, F.; Vacante, M.; Motta, M.; Giordano, M.; Bondi, A.; Basile, F.; Mastrojeni, S.; Mistretta, A.; Malaguarnera, M.; Toscano, M.A. y Salmeri, M. (2012) *Probiotics in the gastrointestinal diseases of the elderly*. J. Nutr. Health Aging 16(4): 402-410.

Maragkoudakis, P.; Nardi, T.; Bovo, B.; Corich, V. y Giacomini, A. (2010) *Valorization of a milk industry by-product as substrate for microbial growth*. J. Biotechnol. 150: S S1-S576.

Maragkoudakis, P.; Vendramin, V.; Bovo, B.; Treu, L.; Corich, V.; Giacomini, A. (2016). *Potential use of scotta, the by-product of the ricotta cheese manufacturing process, for the production of fermented drinks*. J. Dairy Res. 83, 104-108.

Marhamatizadeh, M.; Ehsandoost, E.; Gholami, P.; Moshiri, H. y Nazemi, M. (2012) *Effect of Permeate on Growth and Survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum for Production of Probiotic Nutritive Beverages*. World Appl. Sci. J. 18 (10): 1389-1393.

Martins, A.K.; Martins, F.S.; Gomes, D.A.; Elian, S.D.; Vieira, A.T.; Teixeira, M.M.; Cara, D.C.; Nardi, R.M. y Nicoli, J.R. (2010) *Evaluation of in vitro antagonism and of in vivo immune*

modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of Bifidobacterium animalis var. lactis. Arch. Microbiol. 192(12): 995-1003.

Martins, F.S.; Veloso, L.C.; Arantes, R.M. y Nicoli, J.R. (2009) *Effects of yeast probiotic formulation on viability, revival and protection against infection with Salmonella enterica ssp. enterica serovar Typhimurium in mice.* Lett. Appl. Microbiol. 49(6): 738-744.

Martins, F.S.; Rodrigues, A.C.; Tiago, F.C.; Penna, F.J.; Rosa, C.A.; Arantes, R.M.; Nardi, R.M.; Neves, M.J. y Nicoli, J.R. (2007) *Saccharomyces cerevisiae strain 905 reduces the translocation of Salmonella enterica serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice.* J. Med. Microbiol. 56: 352-359.

Martins, F.S.; Nardi, R.M.; Arantes, R.M.; Rosa, C.A.; Neves, M.J. y Nicoli, J.R. (2005) *Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice.* J. Gen. Appl. Microbiol. 51(2): 83-92.

Mastroeni, P. y Sheppard, M. (2004) *Salmonella infections in the mouse model: host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues.* Emerg. Microb. Infect. 6(4): 398-405.

Matar, C.; Valdez, J.C.; Medina, M.; Rachid, M. y Perdigon, G. (2001) *Immunomodulating effects of milks fermented by Lactobacillus helveticus and its non-proteolytic variant.* J. Dairy Res. 68: 601-609.

McFarland, L.V. (2014) *Use of probiotics to correct dysbiosis of normal microbiota following disease or disruptive events: a systematic review.* BMJ Open 4(8): e005047.

Mehrabani, J.V.; Noaparast, M.; Mousavi, S.M.; Dehghan, R. y Ghorbani A. (2010) *Process optimization and modelling of sphalerite flotation from a low-grade Zn-Pb ore using response surface methodology.* Sep. Purif. Technol. 72: 242-249.

Meng, X.C.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.F.; Daly C. y Rosset R.P. (2008) *Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures.* Food Chem. 106(4): 1406-1416.

Mileti, E.; Matteoli, G.; Iliev, I.D.; Rescigno, M. (2009) *Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of Lactobacilli using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy*. PLoS One 4(9): e7056.

Miyoshi, A.; Rochat, T.; Gratadoux, J.J.; Le Loir, Y.; Oliveira, S.C.; Langella, P. y Azevedo, V. (2003) *Oxidative stress in Lactococcus lactis*. Genet. Mol. Res. 2(4): 348-359.

Moreira, G.E.G.; Costa, M.G.M.; Souza, A.C.R.; Brito, E.S.; Medeiros, M.F.D. y Azeredo, H.M.C. (2009) *Physical properties of spray dried acerola pomace extract as affected by temperature and drying aids*. LWT-Food Sci. Technol. 42: 641-645.

Morris, G.P.; Beck, P.L.; Wallace, J.L.; Herridge, M.S. y Falcone C.A. (1996) *Animal models and pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Neuroendocrinology of gastrointestinal ulceration. Eds.: Szabo, S.; Tache, Y. y Glavin, G. Plenum Press, Nueva York, Estados Unidos, p. 72-91.

Muller, J.A.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F. y Stanton, C. (2009) *Manufacture of probiotic bacteria*. Prebiotics and probiotics science and technology. Eds.: Charalampopoulos, D. y Rastall, R. Springer-Verlag, Nueva York, Estados Unidos, p. 727-762.

Nájera, A.I.; Renovales, M.; Barron, L.J.R. (2003) *Effects of pH, temperature CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study*. Food Chem. 80: 345-352.

Narbona López, E.; Uberos Fernández, J.; Armadá Maresca, M.I.; Couce Pico, M.L.; Rodríguez Martínez, G. y Saenz de Pipaon, M. (2014) *Nutrition and Metabolism Group of the Spanish Neonatology Society: recommendations and evidence for dietary supplementation with probiotics in very low birth weight infants*. An. Pediatr. (Barc). 81(6): 397.e1-8.

Nova, E.; Wärnberg, J.; Gómez-Martínez, S.; Díaz, L.E.; Romeo, J. y Marcos, A. (2007) *Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life*. Br. J. Nutr. 98 Suppl. 1: S90-S95.

O'Hara, A.M. y Shanahan, F. (2006) *The gut flora as a forgotten organ*. EMBO Rep. 7 (7): 688-693.

Olivares, M.; Díaz-Roperero, M.P.; Martín, R.; Rodríguez, J.M. y Xaus, J. (2006) *Antimicrobial potential of four lactobacillus strains isolated from breast milk*. J. Appl. Microbiol. 101: 72-79.

Ong, L.; Henriksson, A. y Shah, N.P. (2006) *Development of probiotic Cheddar cheese containing Lactobacillus acidophilus, Lb. casei, Lb. paracasei and Bifidobacterium spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid*. Int. Dairy J. 16: 446-456.

O'Riordan, K.; Andrews, D.; Buckle, K. y Conway, P. (2001) *Evaluation of microencapsulation of a Bifidobacterium strain with starch as an approach to prolonging viability during storage*. J. Appl. Microbiol. 91: 1059-1066.

Ouwehand, A.C. y Salminen, S.J. (1998) *The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria*. Int. Dairy J. 8: 749-758.

Paéz, R.; Lavari, L.; Audero, G.; Cuatrin, A.; Zaritzky, N.; Reinheimer, J. y Vinderola, G. (2013) *Study of the effects of spray-drying on the functionality of probiotic lactobacilli*. Int. J. Dairy Technol. 66: 155-161.

Páez, R.; Lavari, L.; Audero, G.; Cuatrin, A.; Zaritzky, N.; Reinheimer, J. y Vinderola, G. (2012) *Study of the effects of spray-drying on the functionality of probiotic lactobacilli*. Int. J. Dairy Tech. 66(2): 155-161.

Parente, E.; Ciocia, F.; Ricciardi, A.; Zotta, T.; Felis, G.E. y Torriani, S. (2010) *Diversity of stress tolerance in Lactobacillus plantarum, Lactobacillus pentosus and Lactobacillus paraplantarum: A multivariate screening study*. Int. J. Food Microbiol. 144: 270-279.

Parente, E.; y Zottola, E.A. (1991) *Growth of thermophilic starters in whey permeate media*. J. Dairy Sci. 74: 20-28.

Patel, S. y McCormick, B.A. (2014) *Mucosal inflammatory response to Salmonella typhimurium infection*. Front. Immunol. 5: 311.

Pathmakanthan, S.; Li, C.K.; Cowie, J. y Hawkey, C.J. (2004) *Lactobacillus plantarum 299: beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon*. J. Gastroenterol Hepatol. 19(2): 166-173.

Paul, G.; Khare, V. y Gasche, C. (2012) *Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10*. Eur. J. Clin. Invest. 42(1): 95-109.

Pedersen, M.B.; Gaudu, P.; Lechardeur, D.; Petit, M.A. y Gruss, A. (2012) *Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology*. Ann. Rev. Food Sci. Technol. 3: 37-58.

Peighambardoust, S.; Tafti, A.; y Hejazi, M. (2011) *Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: A review*. Trends in Food Sci. Technol. 22: 215-224.

Perdigón, G.; Maldonado Galdeano, C.; Vinderola, C.G.; de Moreno, A.; Medici, M. y Bibas Bonet, M.E. (2004) *Immunomodulation of mucosal immune response by probiotics*. Curr. Trends Immunol. 6: 69-85.

Pérez Guerra, N.; Fajardo Bernárdez, P.; Méndez, J.; Cachaldor, P. y Pastrana Castro, L. (2007) *Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets*. Anim. Feed Sci. Technol. 134: 89-107.

Perry H.R.; Greene, D.W. y Maloney, J.O. (1985) Eds. Perry's Chemical Handbook, 6^o ed. MacGraw Hill Book Company, New York, USA .

Peters, R.H. (2005) *Economic aspects of cheese making as influenced by whey processing options*. Int. Dairy J. 15: 537-545.

Philippe, D.; Favre, L.; Foata, F.; Adolfsson, O.; Perruisseau-Carrier, G.; Vidal, K.; Reuteler, G.; Dayer-Schneider, J.; Mueller, C. y Blum, S. (2011) *Bifidobacterium lactis attenuates onset of inflammation in a murine model of colitis*. World J. Gastroenterol. 17(4):459-469.

Pintado, J.; J.P. Guyot, J.P. y Raimbault, M. (1999) *Lactic acid production from mussel processing wastes with an amylolytic bacterial strain*. Enzyme Microb. Technol. 24: 590-598.

Pontier-Bres, R.; Munro, P.; Boyer, L.; Anty, R.; Imbert, V.; Terciolo, C.; André, F.; Rampal, P.; Lemichez, E.; Peyron, J.F. y Czerucka, D. (2014) *Saccharomyces boulardii modifies*

Salmonella typhimurium traffic and host immune responses along the intestinal tract. PLoS One 9(8): e103069.

Prasad, J.; McJarrow, P.; y Gopal, P. (2003) *Heat and Osmotic Stress Responses of Probiotic Lactobacillus rhamnosus HN001 (DR20) in Relation to Viability after Drying*. Appl. Environ. Microbiol. 69 (2): 917-925.

Prazeres, A.R.; Carvalho, F. y Rivas, J.J. (2012) *Cheese whey management: a review*. J. Environ. Manage. 110: 48-68.

Preising, J.; Philippe, D.; Gleinser, M.; Wei, H.; Blum, S.; Eikmanns, B.J.; Niess, J.H. y Riedel, C.U. (2010) *Selection of bifidobacteria based on adhesion and anti-inflammatory capacity in vitro for amelioration of murine colitis*. Appl. Environ. Microbiol. 76(9): 3048-3051.

Purchiaroni, F.; Tortora, A.; Gabrielli, M.; Bertucci, F.; Gigante, G.; Ianiro, G.; Ojetti, V.; Scarpellini, E. y Gasbarrini A. (2013) *The role of intestinal microbiota and the immune system*. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 17(3): 323-333.

Quera, P.R.; Quigley, E.M. y Madrid, A.M. (2005) *Sobrecrecimiento bacteriano intestinal*. Rev. Méd. Chile. 133: 1361-1370.

Quigley, E.M. y Flourie, B. (2007) *Probiotics and irritable bowel syndrome: a rationale for their use and an assessment of the evidence to date*. Neurogastroenterol. Motil. 19(3): 166-172.

Rajam, R. y Anandharamakrishnan, C. (2015). *Microencapsulation of Lactobacillus plantarum (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying*. Food Sci. Technol. 60(2): 773-780.

Ranadheera, R.D.C.S.; Baines, S.K. y Adams, M.C. (2010) *Importance of food in probiotic efficacy*. Food Res. Int. 43: 1-7.

Reid, A.A.; Champagne, C.P.; Gardner, N.; Fustier, P. y Vuilleumard, J.C. (2007) *Survival in food systems of Lactobacillus rhamnosus R011 microentrapped in whey protein gel particles*. J. Food Sci. 72(1): M031-7.

Rescigno, M. (2013) *Mucosal immunology and bacterial handling in the intestine*. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 27(1): 17-24.

Ricci, G.; Borgo, F.; Ferrario, C. y Fortina, M. (2011) *Cocoa Powder as Delivery Medium for Probiotic Lactobacillus Strains*. Adv. Microbiol. 1 (1): 1-6.

Riveros, B.; Ferrer, J.; y Borquez, R. (2009) *Spray Drying of a Vaginal Probiotic Strain of Lactobacillus acidophilus*. Drying Technol. 27: 123-132.

Rodrigues, D.; Sousa, S.; Rocha Santos, T.; Silva, J.P.; Sousa Lobo, J.M.; Costa, P.; Amaral, M.H.; Pintado, M.M.; Gomes, A.M.; Malcata, F.X. y Freitas, A.C. (2011) *Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules*. Int. Dairy J. 21: 869-876.

Rokka, S. y Rantamäki, P. (2010). *Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications*. Eur. Food Res. Technol. 231 (1): 1-12.

Ross, R.P.; Desmond, C.; et al. (2005). *Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods*. J. Appl. Microbiol. 98(6): 1410-1417.

Saarela, M.; Virkajarvi, I.; Alakomi, H.L.; Sigvart-Mattila, P. y Mättö, J. (2006) *Stability and functionality of freeze-dried probiotic Bifidobacterium cells during storage in juice and milk*. Int. Dairy J. 16: 1477–1482.

Saarela, M.H.; Alakomi, H.L.; Puhakka, A. y Matto, J. (2009) *Effect of the fermentation pH on the storage stability of Lactobacillus rhamnosus preparations and suitability of in vitro analyses of cell physiological functions to predict it*. J. Appl. Microbiol. 106, 1204-1212.

Sadek, C.; Li, H.; Schuck, P.; Fallourd, Y.; Pradeau, N.; Le Floch-Fou. (2014) *To what extent do whey and casein micelle proteins influence the morphology and properties of the resulting powder?* Drying Technol. 32: 1540-1551.

SAGPyA. (2009) *Elaboración de leche y productos lácteos*. <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/lacteos>

- Sang, L.X.; Chang, B.; Zhang, W.L.; Wu, X.M.; Li, X.H. y Jiang M. (2010) *Remission induction and maintenance effect of probiotics on ulcerative colitis: a meta-analysis*. World J. Gastroenterol. 16(15): 1908-1915.
- Santivarangkna, C.; Kulozik, U. y Foerst, P. (2007) *Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures*. Biotechnol. Progress 23: 302-315.
- Santivarangkna, C.; Aschenbrenner, M.; Kulozik, U. y Foerst, P. (2011) *Role of glassy state on stabilities of freeze-dried probiotics*. J. Food Sci. 76(8): R152-156.
- Santos, R.L. (2014) *Pathobiology of Salmonella, intestinal microbiota, and the host innate immune response*. Front. Immunol. 5: 252.
- Sato, H.; Torimura, M.; Kitahara, M.; Ohkuma, M.; Y. Hotta, Y. y Tamura, H. (2012) *Characterization of the Lactobacillus casei group based on the profiling of ribosomal proteins coded in S10-spc-alpha operons as observed by MALDI-TOF MS*. Syst. Appl. Microbiol. 35: 447-454.
- Saxelin, M.; Grenov, B.; Svensson, U.; Fondén, R.; Reniero, R. y Mattila-Sandholm, T. (1999) *The technology of probiotics*. Trends Food Sci. Technol. 10(12): 387-392.
- Scaldaferri, F.; Gerardi, V.; Lopetuso, L.R.; Del Zompo, F.; Mangiola, F.; Boškoski, I.; Bruno, G.; Petito, V.; Laterza, L.; Cammarota, G.; Gaetani, E.; Sgambato, A. y Gasbarrini A. (2013) *Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility*. Biomed. Res. Int. 2013: 435268.
- Schaller, A. (2008) *Sueros de lechería*. Revista Alimentos Argentinos. Subsecretaría de Agroindustria y Mercados.
- Schepers, A.W.; Thibault, J. y Lacroix, C. (2006) *Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract medium with immobilized Lactobacillus helveticus in a two-stage process*. Enzyme Microb. Technol. 38 (3-4): 324-337.
- Schmid, K.; Schlothauer, R.C.; Friedrich, U.; Staudt, C.; Apajalahti, J. y Hansen, E.B. (2006) *Development of probiotic food ingredients*. En: Probiotics in food safety and human health,

1° edición. Eds.: Goktepe, I.; Juneja, V.K. y Ahmedna, M. Taylor & Francis, Boca Raton, FL, Estados Unidos, p. 35-66.

Schuck, P.; Dolivet, A.; Méjean, S.; Hervé, C. y Jeantet, R. (2013) *Spray drying of dairy bacteria: New opportunities to improve the viability of bacteria powders*. Int. Dairy J. 31: 12-17.

Servin, A.L. (2004) *Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens*. FEMS Microbiol. Rev. 28: 405-440.

Shah, N.P. (2000). *Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival*. Dairy Foods J. Dairy Sci. 83(4): 894-907.

Shokri, Z.; Fazeli, M.R.; Ardjmand, M.; Mousavi, S.M. y Gilani, K. (2015) *Factors affecting viability of Bifidobacterium bifidum during spray drying*. Daru 23: 7.

Shu, B.; Yu, W.; Zhao, Y.; Liu, X. (2006). *Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying*. J. Food Eng. 76 (2006): 664-669.

Silva, A.M.; Bambirra, E.A.; Oliveira, A.L.; Souza, P.P.; Gomes, D.A.; Vieira, E.C. y Nicoli, J.R. (1999) *Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with Salmonella enteritidis subsp. typhimurium in conventional and gnotobiotic mice*. J. Appl. Microbiol. 86(2): 331-336.

Silva, A.M.; Barbosa, F.H.; Duarte, R.; Vieira, L.Q.; Arantes, R.M. y Nicoli, J.R. (2004) *Effect of Bifidobacterium longum ingestion on experimental salmonellosis in mice*. J. Appl. Microbiol. 97(1): 29-37.

Silva, J.; Carvalho, A.S.; Ferreira, R.; Vitorino, R.; Amado, F.; Domingues, P.; Teixeira P. y Gibbs, P.A. (2005) *Effect of the pH of growth on the survival of lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus to stress conditions during spray-drying*. J Appl Microbiol. 98(3): 775-782.

Silva, J.; Freixo, R.; Gibbs, P. y Teixeira, P. (2011) *Spray-drying for the production of dried cultures*. Int. J. Dairy Technol. 64: 321-335.

Simpson, P.J.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.F.; y Ross R.P. (2005) *Intrinsic tolerance of Bifidobacterium species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage*. J. Appl. Microbiol. 99: 493-501.

Siso, G.M.I. (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: a review. Bioresour.Technol. 57: 1-11

Soukoulis, C.; Behboudi-Jobbehdar,S.; Yonekura, L.; Parmenter, C. y Fisk, I. (2013) *Impact of milk protein type on the Viability and storage stability of microencapsulated Lactobacillus acidophilus NCIMB 701748 using spray drying*. Food Bioproc. Technol. 7 (5): 1255-1268.

Souza, T.C.; Zacarias, M.F.; Silva, A.M.; Binetti, A.; Reinheimer, J.; Nicoli, J.R. y Vinderola, G. (2012) *Cell viability and immunostimulating and protective capacities of Bifidobacterium longum 5(1A) are differentially affected by technological variables in fermented milks*. J. Appl. Microbiol. 112: 1184-1192.

Spano, G. y Massa, S. (2006) *Environmental stress response in wine lactic acid bacteria: beyond Bacillus subtilis*. Crit. Rev. Microbiol. 32(2): 77-86.

Spees, A.M.; Kingsbury, D.D.; Wangdi, T.; Xavier, M.N.; Tsolis, R.M. y Bäumler, A.J. (2014). *Neutrophils are a source of gamma interferon during acute Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis*. Infect. Immun. 82(4): 1692-1697.

Suitso, I.; Jögi, E.; Talpsep, E.; Naaber, P.; Lõivukene, K.; Ots, M.L.; Michelson, T. y Nurk, A. (2010) *Protective effect by Bacillus smithii TBMI12 spores of Salmonella enteritidis in mice*. Benef. Microbes 1(1): 37-42.

Suzuki, K.; Ha, S.A.; Tsuji, M. y Fagarasan, S. (2007). *Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut*. Semin. Immunol. 19(2): 127-135.

Strasser, S.; Neureiter, M.; Geppl, M.; Braun, R.; y Danner, H. (2009). *Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria*. J. Appl. Microbiol. 107: 167-177.

Sunny-Roberts, E.O. y Knorr, D. (2009) *The protective effect of monosodium glutamate on survival of <i>Lactobacillus rhamnosus GG and<i> Lactobacillus rhamnosus E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders.* Int. Dairy J. 19(4): 209-214.

Sybesma, W.; Kort, R. y Lee, Y.K. (2015) *Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries?* Trends Biotechnol. 33(4):197-200.

Terán, J.C.; Páez, R.; Pirola, M.B. y Schmidt, E. (2013) *Características generales sobre el uso de suero de queso en la provincia de Santa Fe.* Cuadernillo INTI/INTA.

Teixeira, P., H. Castro and R. Kirby. (1995). *Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of Lactobacillus bulgaricus.* J. Appl. Bacteriol. 78(4): 456–462.

Teixeira, P.; Castro, H.; y Kirby, R. (1994) *Inducible thermotolerance in Lactobacillus bulgaricus.* Lett. Appl. Microbiol. 83: 218-221.

Tiihonen, K.; Ouwehand, A.C. y Rautonen, N. (2010) *Human intestinal microbiota and healthy ageing.* Ageing Res. Rev. 9: 107-116.

Tonon, R.V.; Brabet, C. y Hubinger, M.D. (2008) *Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai powder produced by spray drying.* J. Food Eng. 88(3): 411-418.

Trigueros D.E.G.; Fiorese, M.L.; Kroumov, A.D.; Hinterholz, C.L.; Nadai B.L., Assunção G.M. (2016) *Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for Saccharomyces cerevisiae var. boulardii.* Bioch. Eng. J. 110, 71-83.

Tripathi, M.K. y Giri, S.K. (2014). *Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage.* J. Funct. Foods 9: 225-241.

Truusalu, K.; Mikelsaar, R.H.; Naaber, P.; Karki, T.; Kullisaar, T.; Zilmer, M. y Mikelsaar, M. (2008) *Eradication of Salmonella Typhimurium infection in a murine model of typhoid fever with the combination of probiotic Lactobacillus fermentum ME-3 and ofloxacin.* BMC Microbiol. 8: 132.

- Van Boekel, M.A. (2002) *On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells*. Int. J. Food Microbiol. 74: 139-159.
- van de Guchte, M., Chaze, T., Jan, G., Mistou, M.Y. (2012) *Properties of probiotic bacteria explored by proteomic approaches*. Curr. Opin. Microbiol. 15(3): 381-389.
- Van den Abbeele, P.; Van de Wiele, T.; Verstraete, W. y Sam, P. (2011) *The host selects mucosal and luminal associations of co-evolved gut microbes: a novel concept*. FEMS Microbiol. Rev. 35(4): 681-704.
- Vanderhoof, J.A.; Whitney, D.B.; Antonson, D.L.; Hanner, T.L.; Lupo, J.V. y Young, R.J. (1999) *Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children*. J. Pediatr. 135(5): 564-568.
- Vasiljevic, T. y Shah, N.P. (2008) *Probiotics - From Metchnikoff to bioactives*. Int. Dairy J. 18(7): 714-728.
- Vinderola, C.G. y Reinheimer, J.A. (2000) *Enumeration of Lactobacillus casei in the presence of L. acidophilus, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products*. Int. Dairy J. 10: 271-275.
- Vinderola, C.G.; Prosello, W.; Ghiberto, D.; y Reinheimer, J.A. (2000) *Viability of probiotic (Bifidobacterium, Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei) and non probiotic microflora in Argentinian Fresco Cheese*. J. Dairy Sci. 83 (9): 1905-1911.
- Vinderola, C.G.; Duarte, J.; Thangavel, D.; Perdigón, G.; Farnworth, E. y Matar, C. (2005) *Immunomodulating capacity of kefir*. J. Dairy Res. 72: 195-202.
- Vinderola, C.G.; Mocchiutti, P. y Reinheimer, J.A, (2002) *Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products*. J. Dairy Sci. 85 (4): 721-729.
- Vinderola, G.; Capellini, B.; Villarreal, F.; Suárez, V.; Quiberoni, A. y Reinheimer, J. (2008) *Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use*. LWT- Food Sci. Technol. 41: 1678-1688.

- Vinderola, G.; Matar, C.; Palacios, J. y Perdigón, G. (2007) *Mucosal immunomodulation by the non-bacterial fraction of milk fermented by Lactobacillus helveticus R389*. Int. J. Food Microbiol. 115: 180-186.
- Vinderola, G.; Prosello, W.; Molinari, F.; Ghiberto, D. y Reinheimer, J. (2009) *Growth of Lactobacillus paracasei A13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product*. Int. J. Food Microbiol. 135 (2): 171-174.
- Vinderola, G.; Zacarías, M.F.; Bockelmann, W.; Neve, H.; Reinheimer, J. y Heller, K. (2012) *Resistance to simulated gastric digestion as an indicator of functionality for Bifidobacterium animalis subsp. lactis INL1*. Food Microbiol. 30(1): 274-280.
- Wallace, J.L.; Braquet, P.; Ibbotson, G.C.; MacNaughton, W.K. y Cirino, G. (1989) *Assessment of the role of platelet-activating factor in an animal model of inflammatory bowel disease*. J. Lipid Mediat. 1(1): 13-23.
- Watson, K.G. y Holden, D.W. (2010) *Dynamics of growth and dissemination of Salmonella in vivo*. Cell. Microbiol. 12(10): 1389-1397.
- Wershil, B.K. y Furuta, G.T. (2008) *Gastrointestinal mucosal immunity*. J. Allergy Clin. Immunol. 121(2): S380-383.
- Yan, F. y Polk, D.B. (2004) *Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are*. Curr. Opin. Gastroenterol. 6: 565-571.
- Ying, D.; Schwander, S.; Weerakkody, R.; Sanguansri, L.; Gantenbein-Demarchi, C. y Augustin, M.A. (2013) *Microencapsulated Lactobacillus rhamnosus GG in whey protein and resistant starch matrices: probiotic survival in fruit juice*. J. Funct. Foods. 5: 98-105.
- Ying, D.Y.; Sun, J.; Sanguansri, L.; Weerakkody, R. y Augustin, M.A. (2012) *Enhanced survival of spray-dried microencapsulated Lactobacillus rhamnosus GG in the presence of glucose*. J. Food Eng. 109: 597-602.
- Wang, Y.C.; Yu R.C. y Chou C.C.(2004). *Viability of lactic acid bacteria and bifi dobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage*. Int. J. Food Microbiol. 93(2): 209–17

Zacarías, M.F.; Reinheimer, J.; Forzani, L.; Grangette, C. y Vinderola, G. (2014) *Mortality and traslocation assay to study the protective capacity of Bifidobacterium lactis INL1 against Salmonella Typhimurium infection in mice*. *Benef. Microbes*. 5(4): 427-436.

Zamora, L.M.; Carretero, C. y Pares, D. (2006). *Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying*. *Food Sci. Technol. Int.* 12: 77-84.

Zayed, G. y Roos, Y.H. (2004) *Influence of trehalose and moisture content on survival of Lactobacillus salivarius subjected to freeze-drying and storage*. *Process Biochem.* 9: 1081-1086.

Zotta, T.; Ricciardi, A.; Guidone, A.; Sacco, M.; Muscariello, L.; Mazzeo, M.F.; Cacace, G. y Parente, E. (2012) *Inactivation of ccpA and aeration affect growth, metabolite production and stress tolerance in Lactobacillus plantarum WCFS1*. *Int. J. Food Microbiol.* 155: 51-59.

Zotta, T.; Guidone, A.; Ianniello, R.G.; Ricciardi, A. y Parente, E. (2013) *Aerobic metabolism and oxidative stress tolerance in the Lactobacillus plantarum group*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29: 1713-1722.

Zotta, T.; Ricciardi, A.; Ianniello, R.G.; Parente, E.; Reale, A.; Rossi, F.; Iacumin, L.; Comi, G. y Coppola, R. (2014) *Assessment of aerobic and respiratory growth in the Lactobacillus casei group*. *PLoS One* 9: e99189.

Anexo I: Protocolo de evaluación de microorganismos probióticos

Código Alimentario Argentino (SAGyP N° 22/2011)

Con la denominación de Probióticos, se entiende los microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del consumidor. Para que una cepa pueda ser utilizada como ingrediente probiótico para alimentos deberá cumplir con el siguiente protocolo de Evaluación de un Probiótico como ingrediente para Alimentos:

I. Requisitos Mínimos

1. Identificación de la cepa (Género/especie/subespecie)

Los análisis para la identificación de la cepa deberán ser llevados a cabo por laboratorios reconocidos por la Autoridad Sanitaria o internacionalmente mediante metodología validada.

El método recomendado para la identificación de las cepas de probióticos por técnicas moleculares es el de la secuenciación del 16SrDNA obtenido a partir del 16SrRNA, de acuerdo con: "Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY".

2. Caracterización "*in Vitro*" e "*in Vivo*"

- Resistencia gástrica: ensayo realizado como indicador de que la cepa podrá atravesar la barrera biológica estomacal, arribando viable al intestino. Deberá observarse supervivencia de la cepa en una solución gástrica simulada, a 37°C y en condiciones estandarizadas (tiempo y pH).
- Resistencia a bilis: ensayo realizado como indicador de resistencia de la cepa a esta barrera biológica del organismo, presente a nivel de duodeno. Deberá presentar capacidad de desarrollo en un medio de cultivo adicionado de bilis bovina al 0,3% (entendida como la concentración fisiológica), a 37°C y en condiciones estandarizadas (medio de cultivo y tiempo).

- Resistencia a lisozima (opcional): ensayo realizado como indicador de que la cepa podrá sortear esta barrera biológica presente en la boca (saliva) e intestino delgado. Deberá presentar capacidad de desarrollo en un medio de cultivo adicionado de lisozima, a 37°C y en condiciones estandarizadas (concentración de lisozima, medio de cultivo y tiempo).

3. Ensayos “*in Vivo*” e “*in Vitro*” que demuestren el(los) efecto(s) probiótico(s) adjudicado(s) debidamente documentados y respaldados en estudios efectuados por organismos nacionales y/o internacionalmente reconocidos.

4. Seguridad

La cepa probiótica no debe ser riesgosa para la salud. La bacteria no deberá presentar o promover la translocación bacteriana (pasaje de bacterias del intestino más allá de los nódulos mesentéricos) en las concentraciones en que se encuentra en el alimento. Puede ser medida sembrando en placas agarizadas muestras de sangre y de homogenizados de tejidos de nódulos linfáticos mesentéricos, bazo e hígado de animales de experimentación.

Además se realizarán las pruebas complementarias descritas en el punto II.

II. Pruebas Complementarias para Garantizar la Seguridad de la Cepa

- Resistencia a antibióticos: ensayo realizado como indicador de la presencia de cepas portadoras de genes de resistencia. Visto que la diseminación de antibiótico-resistencia puede reducir las posibilidades terapéuticas en enfermedades infecciosas, se deberá determinar la presencia de resistencia transferible en cepas que serán usadas para consumo humano. Las cepas no deberán ser portadoras de genes de resistencia a antibióticos.

- Actividad hemolítica: ensayo realizado como indicador de la presencia del factor de virulencia responsable de actividad hemolítica. Dicho factor es utilizado principalmente por ciertos microorganismos como fuente de hierro, motivo por el cual causa anemia y edema. Deberá estar ausente en bacterias probióticas.

- Producción de toxinas: las cepas probióticas no deberán producir toxinas. La toxicidad de las cepas hacia la mucosa del tracto gastrointestinal es considerada un importante

aspecto de seguridad. La toxicidad aguda se determina comúnmente en ratones, durante el ensayo en el cual se suministra a los animales una determinada dosis de bacterias (equivalente a la dosis que contendrá el alimento) se observan diariamente posibles cambios en la actividad y comportamiento de los mismos. Después del ensayo, los animales son sacrificados para detectar existencia de cambios patológicos visibles en órganos (estómago, porción dista) del ileum, cecum y colon).

III. Identificación Comercial de la(s) Cepa(s)

El producto se presentará comercialmente en un envase bromatológicamente apto cuyo rótulo indique la identificación precisa de la(s) cepa(s) que lo componga(n) y la concentración de células viables de cada una de ellas (UFC/g) Con la denominación de Alimento con Probióticos, se entiende aquel alimento con una carga de células viables que deberá estar comprendida entre 10^6 y 10^9 UFC/g durante su período de duración mínima.

El producto se rotulará: "... con probióticos" llenando el espacio en blanco con la denominación de venta del alimento correspondiente.

Los alimentos elaborados con probióticos serán autorizados, previa evaluación satisfactoria de los ensayos "*in Vivo*" con el alimento tal cual se va a consumir, que demuestren la funcionalidad que se le atribuye a la(s) cepa(s) probiótica(s) que contiene, de una Comisión Evaluadora integrada por profesionales especializados pertenecientes a la Autoridad Sanitaria o a los que ésta designe a ese efecto para cada caso particular.

La Comisión Evaluadora determinará si es necesario la repetición de los ensayos "*in Vivo*" para aquellos alimentos en los cuales se demuestre que una modificación en la composición del alimento, sobre el cual se llevaron a cabo los ensayos "*in Vivo*", no altera el o los efectos probióticos que se intentan demostrar.

Anexo II: Condiciones y resultados del modelo de Superficie de respuesta.

	<i>T. Entrada (°C)</i>	<i>Flujo de aire (mm)</i>	<i>Caudal de alimentación (%)</i>	<i>T. Salida (°C)</i>	<i>Hum. (%)</i>	<i>Supervivencia (%)</i>
1	130	30	15	90	4,12	81,67
2	110	50	25	62	5,73	18,01
3	120	40	20	70	4,95	98,21
4	130	30	25	74	7,75	35,98
5	130	50	25	73	5,15	28,96
6	120	40	20	70	5,93	82,08
7	130	50	15	82	5,34	91,67
8	110	50	15	69	8,20	70,91
9	110	30	15	71	6,52	77,23
10	120	40	20	70	5,46	58,96
11	120	40	20	74	5,11	46,32
12	110	30	25	92	6,46	31,67
13	120	56	20	70	5,90	15,22
14	120	40	20	73	6,80	11,04
15	120	24	20	84	5,20	14,14
16	120	40	28	61	7,07	41,60
17	120	40	20	68	5,97	62,04
18	120	40	20	68	5,36	71,60
19	136	40	20	80	5,24	15,76
20	104	40	20	57	6,55	11,67