



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS**

Trabajo de Tesis Doctoral

**“DESARROLLO DE CULTIVOS PROBIÓTICOS DESHIDRATADOS  
POR SECADO SPRAY PARA APLICACIÓN EN ALIMENTOS.  
ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS Y TECNOLÓGICOS”**

Tesista: Ing. Alim. (MSc.) Roxana Beatriz Páez

Directora: Dra. Noemí Beatriz Zaritzky

Co-Director: Dr. Jorge Reinheimer

El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el INTA EEA Rafaela, en el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) UNL – CONICET y en el CIDCA – UNLP – CONICET.

La presente Tesis Doctoral se desarrolló en el marco de los proyectos de investigación de INTA:

- “Tecnologías de transformación industrial de materias primas agroalimentarias” AETA 1672 (2006 – 2009) y AETA 281721 (2009 – 2012)
- “Calidad integral de leche y productos lácteos” PNLEC 1102 (2006 – 2009) y PNLEC 071021 (2009 – 2011).



***Dedicatoria***  
***A mi familia....***

## **Agradecimientos**

La ejecución de este trabajo de tesis no hubiera sido posible sin la contribución de muchas personas, que en mayor o menor grado, de cerca o de lejos, en forma permanente u ocasional, me apoyaron igual.

Quiero agradecer especialmente,

A la Universidad Nacional de La Plata y a la Facultad de Ciencias Exactas por haberme permitido realizar mis estudios de postgrado.

Al INLAIN – UNL - CONICET por haberme dado la formación necesaria para poder llevar a cabo este trabajo.

Al INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) por otorgarme la beca que me permitió realizar esta Tesis doctoral.

A la Dra. Noemí Zaritzky, Directora de este trabajo, por su haberme guiado con dedicación y compromiso durante el desarrollo y la escritura de este trabajo. Por su cariño, aliento y apoyo en todo momento.

Al Dr. Jorge Reinheimer, Co -director de este trabajo, por darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su grupo de investigación. Por su confianza y formación.

Al Dr. Gabriel Vinderola, por su permanente guía en mi formación profesional, su apoyo y su constante estímulo durante estos años.

A Luisina, Gabi y Alejandra, mis amigas y colegas, por su invaluable colaboración y por haber sido compañeras fieles en los más arduos momentos de trabajo en el laboratorio y análisis de la información.

A mis colegas de INTA el Ing. Miguel Taverna, el Dr. Luis Calvinho, la Dra. Adriana Descalzo y la Dra. Claudia Gonzalez, por el apoyo permanente y la confianza.

A todos mis compañeros de trabajo del Grupo Calidad de leche y del Laboratorio Sanidad Animal de INTA, por su permanente disposición a colaborar y por su amistad.

A todos los colegas del INLAIN por haberme recibido como parte de su laboratorio, especialmente a la Dra. Andrea Quiberoni por haberme introducido al tema de probióticos con tanta consideración, paciencia y minuciosidad.

A mi familia, por estar siempre a mi lado, por el amor y la paciencia.

A cada persona que sin ser mencionada, se siente aludida igual...Gracias!!!

Los resultados de este trabajo de Tesis fueron publicados a través de los siguientes trabajos científicos:

1. Study of the effects of spray-drying on the functionality of probiotic lactobacilli. (2013). Paez, Roxana; Lavari, Luisina; Audero, Gabriela; Cuatrin, Alejandra; Zaritzky, Noemi; Reinheimer, Jorge and Vinderola, Gabriel. ***International Journal of Dairy Technology* 66 (2), 155 – 161.**
2. Effect of spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. (2012). Paez, Roxana; Lavari, Luisina; Vinderola, Gabriel; Audero, Gabriela; Cuatrin, Alejandra; Zaritzky, Noemi; Reinheimer, Jorge. ***Food Research International* 48: 748 – 754.**
3. Microencapsulación de bacterias probióticas comerciales en leche por secado spray. Influencia de un pretratamiento térmico y del almacenamiento a diferentes temperaturas sobre la viabilidad celular. (2009) Paéz R, Vinderola G, Zaritzky N, Quiberoni A, Audero G, Cuatrin A y Reinheimer J. **Proceedings del XII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos - CYTAL**

### **Congresos**

1. XIII Jornadas Argentinas de microbiología. Rosario. (2008). Secado spray de bacterias probióticas para su uso en alimentos deshidratados. Influencia del pre-tratamiento térmico en la viabilidad post-secado. **Paéz R; Vinderola G; Reinheimer J, Quiberoni A, Audero G y Zaritzky N.**
2. 3º Congreso Internacional de Cs. y Tecn. de los alimentos. Córdoba. (2009). Microencapsulación de bacterias probióticas comerciales en leche por secado

- spray. Influencia de un pretratamiento térmico y del almacenamiento a diferentes temperaturas sobre la viabilidad celular. **Paéz R**, Vinderola G, Zaritzky N, Quiberoni A, Audero G, Cuatrin A y Reinheimer J.
3. IDF/DIAA Functional dairy Foods. Australia. (2009). Microencapsulation of probiotic bacterias in milk by dried spray. Influence of heat on survival of pre-thermal treatment during the storage at different temperatures. **Paéz R**, Vinderola G, Zaritzky N, Quiberoni A, Audero G, Cuatrin A. y Reinheimer J.
  4. XIV Congreso Argentino de Microbiología. (2010). Efecto del secado spray y la matriz sobre la viabilidad y resistencia gástrica de lactobacilos probióticos. **Paéz R**, Vinderola G, Lavari L, Zaritzky N y Reinheimer, J.
  5. XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. (2011). Microencapsulacion de lactobailos probióticos por secado spray. Efecto sobre la funcionalidad *in vitro e in vivo*. **Paéz Roxana**, Lavari Luisina, Vinderola Gabriel, Audero Gabriela, Cuatrin Alejandra, Zaritzky Noemí y Reinheimer Jorge.

### **Distinciones obtenidas**

- Mención especial otorgada por CONICET y DuPont Argentina al proyecto *“Producto lácteo probiótico en polvo enriquecido naturalmente en compuestos nutraceuticos”*. Programa de Apoyo al Desarrollo Científico Tecnológico DuPont-Conicet 2005.
- Mención especial al proyecto *“Leche Alfa – Bio”* en el premio ArgenINTA a la calidad Agroalimentaria 2005.
- Mención especial al proyecto *“Microencapsulación de bacterias probióticas”* en el premio ArgenInta a la calidad Agroalimentaria 2012. Categoría: Proyecto de Investigación y desarrollo. Diciembre 2012.



# ***Índice***

---

Índice de figuras.....	14
Índice de tablas.....	18
Resumen.....	20
<b>CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN</b>	
<hr/>	
<b>I.1. Alimentos Funcionales</b>	23
<b>I.2. Probióticos</b>	24
I.2.1. Evolución del concepto “probiótico”. Definición y propiedades	24
I.2.2. Probióticos comerciales	26
I.2.3. Selección de probióticos	29
I.2.4. Efectos benéficos de los probióticos a la salud	31
I.2.5. Seguridad y estabilidad de los microorganismos probióticos. Aspectos tecnológicos para su aplicación en alimentos.	35
<b>I.3. Preservación de cultivos probióticos</b>	40
I.3.1. Proceso tradicional de deshidratación: liofilización.	42
I.3.2. Microencapsulación	44
I.3.3. Secado spray. Principios del secado spray	53
I.3.4. Parámetros que afectan la viabilidad celular	56
I.3.4.a Factores intrínsecos que influyen en la viabilidad	64
I.3.4.b Factores extrínsecos que influyen en la viabilidad	66
I.3.5. Rehidratación	78
I.3.6. Evaluación de supervivencia y actividad de células deshidratadas	80
<b>I.4. Probióticos encapsulados incorporados en alimentos</b>	82
<b>I.5. Hipótesis. Objetivos específicos.</b>	91
<b>CAPÍTULO II – MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<hr/>	
<b>II.1. Cepas utilizadas en el estudio</b>	94
II.1.1. Conservación y reactivación de las cepas	95
II.1.2. Evaluación de resistencia térmica intrínseca de las cepas	96
II.1.3. Evaluación de pureza de las cepas	98
II.1.4. Identificación de las cepas mediante secuenciación del gen	

16rRNA	98
<b>II.2. Deshidratación de bacterias probióticas</b>	<b>101</b>
II.2.1 Secadero Spray	101
II.2.2 Descripción del proceso de pulverización	103
II.2.3. Parámetros del proceso	105
<b>II.3. Procedimiento aplicado para deshidratación de bacterias probióticas por secado spray</b>	<b>108</b>
<b>II.4. Procedimientos ejecutados en los ensayos</b>	<b>112</b>
II.4.1. Evaluación del efecto del tratamiento térmico subletal previo al secado spray	112
II.4.2. Evaluación del efecto de diferentes matrices de secado	115
II.4.3. Ensayos de adición en alimentos	117
II.4.3.1. Adición de bacterias probióticas microencapsuladas a leche entera en polvo (LEP)	117
II.4.3.2. Adición de bacterias probióticas microencapsuladas en diferentes alimentos líquidos y sólidos	117
<b>II.5. Caracterización de los probióticos deshidratados</b>	<b>119</b>
II.5.1 Características físico - químicas	119
II.5.1.1. Determinación de humedad residual	119
II.5.1.2. Determinación de humectabilidad	119
II.5.1.3. Determinación de $a_w$	120
II.5.2. Pruebas de viabilidad y estabilidad en cultivos frescos y deshidratados	120
II.5.3. Estudio de digestión gástrica simulada	121
II 5.4. Estudios con microscopía electrónica	123
II.5.5. Pruebas de funcionalidad con probióticos frescos y deshidratados	124
II.6. Medios de cultivo y soluciones	125
II.6.1. Medios de cultivo utilizados	125
II.6.2. Preparación de medios de cultivo	126
II.6.3. Soluciones utilizadas	126

II.6.4. Preparación de soluciones	127
<b>II.7. Equipamiento general de laboratorio</b>	<b>128</b>

**CAPÍTULO III - DESHIDRATACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS POR SECADO SPRAY. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO TÉRMICO Y DEL ALMACENAMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.**

---

<b>III.1. Objetivo</b>	134
<b>III.2. Materiales y Métodos</b>	134
III.2.1 Cepas y condiciones de cultivo	134
III.2.2 Ensayo de tolerancia térmica	134
III.2.3 Secado spray en leche descremada	135
III.2.4 Estabilidad de la resistencia mejorada al secado por pulverización obtenidos por el tratamiento térmico	136
III.2.5 Secado Spray en diferentes matrices alimenticias	137
III.2.6 Análisis estadísticos	137
<b>III.3. Resultados</b>	138
<b>III.4. Discusión</b>	155
<b>III.5. Conclusiones del capítulo</b>	159

**CAPÍTULO IV - EFECTO DEL SECADO SPRAY SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LACTOBACILOS PROBIÓTICOS.**

---

<b>IV.1. Objetivo</b>	161
<b>IV.2. Materiales y Métodos</b>	161
IV.2.1 - Cepas y condiciones de cultivo	161
IV.2.2 - Secado spray en leche descremada	161
IV.2.3 - Estudios con microscopía electrónica	162
IV.2.4 - Ensayo de funcionalidad In Vitro.	162
IV.2.4.1 - Resistencia a la digestión gastrointestinal simulada en las cepas en estudio	162
IV.2.4.2 - Resistencia a la digestión gastrointestinal simulada	

en diferentes matrices alimenticias	163
IV.2.5 - Ensayo de funcionalidad In vivo	164
IV.2.6 - Análisis Estadístico	165
<b>IV.3. Resultados</b>	166
<b>IV.4. Discusión</b>	177
<b>IV.5. Conclusiones del capítulo</b>	182
<b>CAPÍTULO V - ADICIÓN DE PROBIÓTICOS MICROENCAPSULADOS POR SECADO SPRAY EN DIFERENTES MATRICES ALIMENTARIAS.</b>	
<hr/>	
<b>V.1. Objetivos</b>	184
<b>V.2. Materiales y Métodos</b>	184
V.2.1 - Prueba de adición en alimentos de diferentes pH	184
V.2.2 - Leche en Polvo <i>Alfa – Bio</i>	185
V.2.3 Análisis Estadísticos	186
<b>V.3. Resultados</b>	187
V.3.1. Adición en alimentos como suplemento alimenticio	187
V.3.2 Leche en Polvo <i>Alfa-BIO</i> : Producto lácteo probiótico en polvo enriquecido naturalmente en compuestos nutracéuticos	192
<b>V.4. Discusión</b>	199
V.4.1. Suplemento dietario	199
V.4.2. Leche en Polvo <i>Alfa – Bio</i>	201
<b>V.5. Conclusiones del capítulo</b>	205
<b>CAPÍTULO VI - CONCLUSIONES GENERALES. PERSPECTIVAS A FUTURO</b>	207
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	212

## INDICE DE FIGURAS

---

### CAPÍTULO I – INTRODUCCIÓN

**Figura I.1.** Diversos tipos de estrés que afectan a los cultivos starter y probióticos durante la producción industrial.

**Figura I.2.** Principales factores de stress que afectan la viabilidad de los probióticos desde la producción al tracto gastrointestinal

**Figura I.3.** Representación esquemática de sistemas de encapsulación

**Figura I.4.** Rango de tamaños de capsulas por cada tecnología de encapsulación de probióticos aplicada

**Figura I.5.** Diagrama de flujo de la encapsulación de probióticos mediante las técnicas de emulsión y extrusión o goteo. Ejemplo realizado empleando alginato como matriz de encapsulación.

**Figura I.6.** Presentación esquemática de la microencapsulación de células probióticas mediante coagulación de proteínas lácteas.

**Figura I.7.** Esquema del proceso de atomización

**Figura I.8.** Presentación esquemática del proceso de deshidratación de probióticos por secado spray.

**Figura I.9.** Presentación esquemática del proceso de deshidratación de probióticos por secado spray. Enumeración de factores intrínsecos y extrínsecos que afectan el proceso.

**Figura I.10.** Supervivencia de *L. paracasei* NFBC 338 durante el secado spray en LPD al 20%.

**Figura I.11.** Supervivencia de *L. paracasei* NFBC 338 durante el secado spray en LPD al 20% suplementada con 0,5% (p/v) de extracto de levadura a diferentes temperaturas de salida de aire

**Figura I.12.** Esquema de posibilidades de producción e incorporación de probióticos en diferentes tipos de alimentos.

**Figura I.13.** Efecto de los alimentos funcionales y específicamente los probióticos en el tracto gastrointestinal

## **CAPÍTULO II - METODOLOGÍA**

**Figura II.1a y II.1b.** Diagrama de procedimiento aplicado para la evaluación de resistencia térmica intrínseca en las cepas del estudio

**Figura II.2.** Determinación de pureza en las cepas

**Figura II.3.** Mini Spray Dryer Büchi B 290 – Suiza

**Figura II.4.** Componentes del Mini Spray Dryer Büchi B290.

**Figura II.5.** Tobera de dos fases del Mini Spray Dryer Büchi B290

**Figura II.6.** Componentes del Mini Spray Dryer Büchi B290.

**Figura II.7.** Procedimientos de secado aplicados a bacterias lácticas sugeridos en las aplicaciones de Büchi

**Figura II.8.** Diagrama de procedimiento aplicado para el secado de bacterias probióticas

**Figura II.9.** Flow sheet de la preparación de concentrados probióticos deshidratados

**Figura II.10a.** Diagrama de procedimiento para la aplicación de pretratamiento térmico previo al secado spray

**Figura II.10b.** Diagrama de procedimiento para la evaluación del mantenimiento temporal del efecto de mejora transitoria de la resistencia térmica por aplicación de stress subletal

**Figura II.11.** Diagrama de procedimiento aplicado para el secado spray de bacterias probióticas suspendidas en diferentes matrices.

**Figura II.12.** Preparación de las cepas para la digestión gástrica simulada.

**Figura II.13.** Diagrama de procedimiento de la digestión gástrica simulada a partir de cultivo fresco y cultivo deshidratado.

**Figura II.14.** Ensayos in vivo con ratones en el Bioterio del INLAIN – UNL.

## **CAPÍTULO III - DESHIDRATACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS POR SECADO SPRAY. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO TÉRMICO Y DEL ALMACENAMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.**

**Figura III.1.** Dendograma de la distancia euclídea entre cepas de lactobacilos

**Figura III.2.** Porcentaje de supervivencia al secado spray con (CPTT) o sin pretratamiento térmico (SPTT).

**Figura III.3.** Supervivencia *L.pl. INL* (a), *L.p. A13* (b), *L.pl. 8329* (c), *L.a. A9* (d) and *L.c. Dan* (e) secadas spray,

**Figura III.4.** Perdida de viabilidad expresada a través de la tasa de inactivación (k) de cada cepa

**Figura III.5.** Visión conjunta de las tasas de inactivación de bacterias probióticas a 25°C basada en datos de la literatura.

**Figura III.6.** Viabilidad en cultivos frescos y deshidratados en diferentes matrices de secado.

#### **CAPÍTULO IV – EFECTO DEL SECADO SPRAY SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LACTOBACILOS PROBIÓTICOS**

**Figura IV.1.** Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM) de *L.c. A13* antes (a y b) y después (c, d, e, f) del secado por atomización en leche descremada.

**Figura IV.2.** Supervivencia de *L.c. Dan* (a), *L.a. A9* (b) y *L.p. A13* (c) como cultivo fresco (línea sólida) o deshidratado (línea entrecortada) durante la digestión gastrointestinal simulada.

**Figura IV.3.** Micrografías SEM de la cepa *L.c. Dan* como cultivo fresco y deshidratado en diferentes matrices de secado

**Figura IV.4.** Efecto de la administración oral de lactobacilos *L.c. Dan*, *L.p. A13* y *L.a. A9* sobre el número de células IgA +

**Figura IV.5.** Efecto de los días de administración oral de lactobacilos sobre el número de células IgA+

**Figura IV.6.** Cortes histológicos de intestino delgado. Células IgA+ identificadas por fluorescencia.

#### **CAPÍTULO V - INCORPORACIÓN DE PROBIÓTICOS DESHIDRATADOS EN ALIMENTOS.**

**Figura V.1.** Viabilidad de *L.p. A13* (A), *L.a. A9* (B) y *L.c. Dan* (C) en alimentos adicionados.

**Figura V.2.** Viabilidad de *L.p. A13* deshidratado adicionado en leche entera en polvo, almacenada a 25° C durante 120 días.



**Figura V.3.** Pérdida de viabilidad expresada a través de la tasa de inactivación ( $k$ ) de la cepa L.p. A13 deshidratada sola y adicionada en leche entera en polvo, almacenada a 25° C.

**Figura V.4.** Constantes de inactivación de las mezclas de LEP con la L.p. A13 (M1 y M2).

## INDICE DE TABLAS

---

### CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN

**Tabla I.1.** Algunas cepas de probióticos utilizadas en aplicaciones comerciales

**Tabla I.2.** Criterios a tener en cuenta para la selección de probióticos de aplicación comercial

**Tabla I.3.** Resultados y beneficios clínicos más frecuentes obtenidos con la administración de probióticos en pediatría

**Tabla I.4.** Algunos microorganismos probióticos comerciales y efectos demostrados sobre la salud

**Tabla I.5.** Propiedades tecnológicas de los probióticos.

**Tabla I.6.** Ejemplos de probióticos encapsulados por secado spray o por spray coating aplicados en diversos alimentos.

### CAPÍTULO II - METODOLOGÍA

**Tabla II.1.** Cepas utilizadas para el ensayo screening de resistencia térmica

**Tabla II.2.** Influencia de las variables del secado por atomización en el Mini Spray Dryer Büchi B290.

### CAPÍTULO III - DESHIDRATACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS POR SECADO SPRAY. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO TÉRMICO Y DEL ALMACENAMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

**Tabla III.1.** Resistencia térmica (muerte celular en ciclos log) de cepas de *Lactobacillus*.

**Tabla III.2.** Supervivencia de lactobacilos al secado spray (SS) en leche descremada en polvo reconstituida al 20% con pretratamiento térmico (CPTT) o sin pretratamiento térmico (SPTT).

**Tabla III.3.** Recuento celular de *L.c.* Dan y *L.pl.* 8329 antes o después del secado spray (SS).

**Tabla III.4.** Tiempo de reducción decimal D (días) de diferentes cepas deshidratadas utilizando LPD como carrier durante el almacenamiento a 5º, 25º y 37º C.

**Tabla III.5.** Efecto de las diferentes matrices de secado sobre propiedades tecnológicas de lactobacilos deshidratados.

**Tabla III.6.** Supervivencia de lactobacilos al secado spray (SS) en diferentes matrices lácteas.

#### **CAPÍTULO IV – EFECTO DEL SECADO SPRAY SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LACTOBACILOS PROBIÓTICOS**

**Tabla IV.1.** Resistencia a la digestión gástrica simulada y a la exposición a bilis de lactobacilos en estado fresco o deshidratado en leche descremada.

#### **CAPÍTULO V - INCORPORACIÓN DE PROBIÓTICOS DESHIDRATADOS EN ALIMENTOS**

**Tabla V.1.** Parámetros de calidad de los concentrados probióticos deshidratados para ser adicionados en diversas matrices alimentarias.

**Tabla V.2.** Concentración inicial de células en el aditivo probiótico y pH de los alimentos líquidos utilizados.

**Tabla V.3.** Concentración inicial de células en el aditivo probiótico y pH de los alimentos sólidos utilizados.

**Tabla V.4.** Efecto de la inclusión de la pastura de alfalfa en la dieta sobre propiedades funcionales en la leche.

**Tabla V.5.** Características de la leche entera en polvo “LEP alfa”.

## RESUMEN

---

El mercado de alimentos funcionales, en particular aquellos que incorporan bacterias probióticas, se encuentra en constante expansión. La diversificación del mercado de bacterias probióticas genera la necesidad de disponer de cultivos comerciales en diferentes presentaciones. Para leches fermentadas y quesos, los cultivos concentrados congelados han sido los de mayor difusión comercial, por su menor costo respecto a los cultivos liofilizados. El secado spray es una tecnología aún no utilizada a nivel comercial en el país para la producción de cultivos probióticos de uso en alimentos, a pesar de contar con la capacidad instalada para hacerlo, lo que ofrece una oportunidad para el desarrollo de probióticos nacionales.

Se estudió el secado spray, como alternativa de menor costo a la liofilización, aplicado como método de conservación de bacterias probióticas, evaluando supervivencia, funcionalidad, aspectos morfológicos y tecnológicos de los concentrados de probióticos en polvo obtenidos.

Se presentan resultados que demuestran que existen cepas de bacterias probióticas con adecuada tolerancia al proceso de secado spray mientras que, para cepas sensibles, el pretratamiento térmico puede ser una alternativa para mejorar su viabilidad. Con las condiciones de secado aplicadas se obtuvieron polvos con valores de humedad y  $a_w$  que aseguran una correcta conservabilidad de los mismos.

Los resultados del ensayo de almacenamiento fueron diferentes para cada cepa. La máxima sobrevivencia de los probióticos microencapsulados se alcanzó en el almacenamiento a 4°C envasados al vacío y, para todas las cepas, la sobrevivencia estuvo inversamente relacionada con la temperatura de almacenamiento de los polvos. No se

observaron diferencias en la viabilidad celular antes y después del secado spray para las cepas en las tres matrices soporte ensayadas (leche descremada, leche descremada más almidón y leche descremada más concentrado de proteínas de suero).

Por otro lado, dado que se ha comprobado que los recuentos celulares brindan sólo información parcial sobre la funcionalidad de una cepa sometida a tratamientos tecnológicos como el secado spray, se planteó la realización estudios de funcionalidad *in vitro* e *in vivo*.

Se demostró que el secado spray produce efectos cepa-dependientes sobre la resistencia gastrointestinal en función de la matriz empleada, induciendo una mayor resistencia gastrointestinal cuando se utiliza como matriz soporte leche descremada adicionada con almidón, en relación al secado solo con leche descremada. También se verificó que el proceso de secado spray no modifica la capacidad de inducir proliferación de células IgA+ en las cepas probióticas evaluadas.

Se demostró que es posible lograr y conservar sin refrigeración al menos por 4 (cuatro) meses una leche en polvo funcional, enriquecida naturalmente en vitamina antioxidante y ácidos grasos  $\omega 3$  y adicionada con probióticos deshidratados, asegurando que se alcanza la dosis requerida para lograr el efecto benéfico en la salud.

Los resultados obtenidos sugieren que el secado spray es una tecnología adecuada y económica para la conservación de bacterias probióticas en medios lácteos. Las cepas microencapsuladas por secado spray en leche descremada enriquecida con otros ingredientes tales como almidón o concentrado de proteínas de suero demostraron un buen potencial para su uso en alimentos funcionales.

# ***Capítulo I.***

## ***Introducción***

---

## I.1. Alimentos Funcionales

Aunque el concepto de alimentos funcionales se introdujo hace mucho tiempo con Hipócrates y su lema "Que el alimento sea tu medicina", hace relativamente poco tiempo que la evidencia comenzó a apoyar la hipótesis de que la dieta puede jugar un papel importante en la modulación de las funciones fisiológicas importantes en el cuerpo (Vasiljevic y Shah, 2008). Tal dependencia está comprobada en enfermedades tales como la diabetes no insulina-dependiente, la osteoporosis, la hipertensión, el cáncer del tubo digestivo o de mama, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, etc. Existe por tanto posibilidad de mejorar la salud a través de una alimentación adecuada.

En los años recientes se ha incrementado el interés del consumidor por su salud y su expectativa es que los alimentos que consuma, contribuyan a ella y más aún, que sean capaces de prevenir enfermedades, sobre todo porque factores tales como el estilo de vida, la exposición constante a factores de estrés, los cambios en los patrones dietéticos y hábitos alimenticios, así como el consumo de fármacos (en particular antibióticos), afectan negativamente la salud (Markowitz y Bengmark, 2002). Lo anterior, ha favorecido la demanda de alimentos que favorecen el buen estado de salud, llamados también **"alimentos funcionales"**.

De acuerdo al Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine de Estados Unidos, **un alimento funcional es "un ingrediente o suplemento alimenticio que aporta un beneficio funcional adicional específico (fisiológico o psicológico) a su valor nutricional básico"** (Wildman, 2007). Es importante recalcar, que los alimentos funcionales promueven la salud, no curan las enfermedades (Sanders, 1998a).

En el pasado, los alimentos fueron considerados en términos de su valor dietético natural. Actualmente, las expectativas puestas sobre ellos van más allá de dicho valor, prevaleciendo su contribución favorable a nuestra salud. En el futuro, se estima que la relación con nuestra dieta evolucionará hacia un tipo de nutrición personalizada, caracterizada por una mejor comprensión de la nutrición molecular.

Los alimentos probióticos son, tal vez, el ejemplo mejor caracterizado y estudiado de los alimentos funcionales y junto con los prebióticos representan el segmento más grande de los alimentos funcionales en el mercado de Europa, Japón y Australia.

El mercado de esta categoría de alimentos continúa expandiéndose en paralelo con el creciente interés de los consumidores sobre el papel de la dieta en la conservación y mantenimiento de la salud (Stanton et al., 2001) presentándose un escenario económico oportuno y favorable para la industria láctea y de los alimentos.

El incremento del consumo de probióticos plantea la necesidad por parte de la industria alimentaria de mayor conocimiento científico para desarrollar nuevos métodos, optimizar la producción y conservación, y mejorar la calidad, seguridad y funcionalidad de los mismos.

## **I.2. Probióticos**

### **I.2.1. Evolución del concepto. Definición y propiedades**

En 1907 el científico ruso **Ellie Metchnikoff** manifestó los efectos benéficos de las bacterias en su libro "La prolongación de la vida" y presentó el concepto de "sustitución de microbios nocivos por microbios útiles", relacionando el consumo de leches fermentadas en pueblos caucásicos con la salud intestinal y la longevidad (Metchnikoff, 1907). Un año antes, **Henry Tissier** expuso que las bifidobacterias son la



especie dominante en la microflora de los lactantes amamantados y recomendó la administración de bifidobacterias para dejar fuera de competencia a las bacterias de putrefacción en niños que padecían diarrea. Las BAL (acrónimo de bacterias del ácido láctico) fueron seleccionadas para este propósito por ser microorganismos que fermentaban la leche mediante un proceso natural, previniendo con ello el crecimiento de bacterias no ácido tolerantes, incluyendo las especies proteolíticas. Si la fermentación láctica prevenía la putrefacción de la leche, posiblemente tuviera el mismo efecto en el tracto digestivo.

Investigaciones posteriores confirmaron que el consumo de BAL causaba un efecto beneficioso sobre la salud. Por ejemplo, en los años 30 se emplearon preparaciones con *Lactobacillus acidophilus* para aliviar el estreñimiento, mientras que en Japón, **Shirota** (1930) aisló y cultivó con éxito una cepa de lactobacilo capaz de sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal. Esa cepa se identificó como *Lactobacillus casei* Shirota y fue empleada con éxito en la elaboración de un producto lácteo fermentado conocido como "Yakult" (Fooks y Gibson, 2002; Vasiljevic & Shah, 2008). Recién en las décadas del 50 y 60 se introdujo el concepto de probiótico.

El término "Probiótico" fue inicialmente utilizado como un antónimo de la palabra antibiótico, cuya raíz es de origen griego (pro =vida). Fue presentado por **Lilly y Stillwell** en el año 1965 y luego de varias redefiniciones, el grupo de trabajo del Programa Conjunto de la Alimentación y la Organización para la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS por sus siglas en inglés), definió en el 2001 al término "probiótico" como **"microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción fisiológica beneficiosa sobre la salud del hospedador"** (FAO/WHO, 2002). Consecuentemente, una gran variedad de

especies y géneros pueden considerarse potenciales probióticos (bacterias ácido lácticas, bifidobacterias, *Bacillus*, levaduras, enterococos). Sin embargo, comercialmente los probióticos más importantes son bacterias ácido lácticas.

Las BAL son un grupo de microorganismos no formadores de esporos, catalasa y oxidasa negativos, Gram positivos, que prefieren condiciones de anaerobiosis pero son aerotolerantes y fermentadores estrictos, generando ácido láctico como producto principal de la fermentación de carbohidratos. Las BAL se subdividen en dos grupos en función del metabolismo de los carbohidratos: homofermentativas, obteniéndose exclusivamente ácido láctico, y heterofermentativas produciendo lactato, CO<sub>2</sub>, etanol o acetato. Los géneros más importantes dentro de este grupo son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. Desde el punto de vista de la industria láctea se utilizan las BAL como starters (cultivo acidificante en los procesos de elaboración de queso y yogurt) ó como probióticos (cultivo adjunto).

### **I.2.2. Probióticos comerciales**

Los cultivos probióticos han sido explotados ampliamente por la industria láctea como herramienta para el desarrollo de productos funcionales. Tradicionalmente, los probióticos han sido incorporados al yogur, sin embargo, hoy se encuentran probióticos adicionados en otros carriers tales como mayonesa (Khalil y Mansour, 1998), carne (Arihara et al., 1998), quesos (Vinderola et al., 2000a; Ong et al., 2006), etc. Los probióticos también están disponibles adicionados en otros productos de origen lácteo (tales como las leches y leches fermentadas), y en jugo de frutas, helados, fórmulas infantiles y productos a base de avena.

Los cultivos comerciales utilizados en estas aplicaciones son principalmente cepas de *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*; algunos de ellos se listan en la **Tabla I.1**.

Los alimentos probióticos se fabrican ya sea mediante la adición de la cepa deseada al mismo tiempo que el cultivo iniciador en el tanque de fermentación o mediante la ejecución de la fermentación en una reacción separada y añadiendo los probióticos después como cultivos adjuntos (Champagne et al., 2005). Las cepas de probióticos se utilizan principalmente como cultivos adjuntos debido a su pobre crecimiento en la leche durante la fermentación (Shah, 2004).

**Tabla I.1.** Algunas cepas de probióticos utilizadas en aplicaciones comerciales (adaptado de Holm, 2003; Shah, 2004)

<b>Cepa</b>	<b>Fuente</b>
<i>L. acidophilus</i> LA1/LA5	<b>Chr. Hansen</b>
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> Lb12	
<i>L. paracasei</i> CRL431	
<i>B. animalis</i> spp. <i>lactis</i> Bb12	
<i>L. acidophilus</i> LAFTI L10	<b>DSM Food Specialties</b>
<i>B. lactis</i> LAFTI B94	
<i>L. paracasei</i> LAFTI L26	
<i>L. johnsonii</i> La1	<b>Nestle</b>
<i>L. acidophilus</i> SBT-20621	<b>Snow Brand Milk Products Co.</b>
<i>B. longum</i> SBT-29281	<b>Ltd.</b>
<i>L. rhamnosus</i> R0011	<b>Institute Rosell</b>
<i>L. acidophilus</i> R0052	
<i>L. casei</i> Shirota	<b>Yakult</b>
<i>B. breve</i> strain Yakult	
<i>B. lactis</i> HN019 (DR10)	<b>Fonterra</b>
<i>L. rhamnosus</i> HN001 (DR20)	
<i>L. plantarum</i> 299V	<b>Probi AB</b>
<i>L. rhamnosus</i> 271	
<i>L. casei</i> Immunitas	<b>Danone</b>
<i>B. animalis</i> DN173010 (Bioactiva)	
<i>L. rhamnosus</i> LB21	<b>Essum AB</b>
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	
<i>L. reuteri</i> SD2112	<b>Biogaia</b>
<i>L. rhamnosus</i> GG1	<b>Valio Dairy</b>
<i>L. salivarius</i> UCC118	<b>University College Cork</b>
<i>B. longum</i> BB536	<b>Morinaga Milk Industry Co. Ltd.</b>
<i>L. acidophilus</i> LB	<b>Lacteol Laboratory</b>
<i>L. paracasei</i> F19	<b>Medipharm</b>

### I.2.3. Selección de bacterias probióticas

Para poder considerar a un microorganismo como probiótico éste debe cumplir con los siguientes requisitos (Ramos-Cormenzana et al., 2005; Saulnier et al., 2009):

- Estar depositado en una colección de cultivo internacional reconocida y ser perfectamente caracterizado a nivel de género, especie y cepa.
- Ser seguro para el hospedador, determinado mediante ensayos in vitro y/o en animales de experimentación si es necesario.
- Estar viables en el momento de su consumo, aunque se ha reconocido que las células no viables pueden mediar algunos efectos beneficiosos a nivel fisiológico.
- Ser capaces de sobrevivir a su paso por el tracto gastrointestinal, lo cual se determina mediante una serie de pruebas estándares:
  - Resistencia al pH gástrico y a sales biliares. Capacidad de adhesión a la mucosa y/o células epiteliales humanas o a líneas celulares.
  - Actividad antimicrobiana frente a potenciales microorganismos patógenos.
  - Proporcionen algún beneficio fisiológico demostrado mediante estudios llevados a cabo en los organismos diana.

Algunos criterios propuestos para la selección de microorganismos probióticos con aplicaciones comerciales se muestran en la **Tabla I.2.**

**Tabla I.2.** Criterios a tener en cuenta para la selección de probióticos de aplicación comercial (Vasiljevic y Shah, 2008).

<b>Criterio</b>	<b>Propiedad</b>
<b>Seguridad</b>	Origen Patogenia e infectividad (ausencia) Factores de virulencia – toxicidad, actividad metabólica y propiedades intrínsecas como la resistencia a antibióticos
<b>Tecnológico</b>	Cepas genéticamente estables Viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento Buenas propiedades sensoriales Resistencia a fagos Producción a gran escala
<b>Biológico/Funcional</b>	Tolerancia al ácido y a los jugos gástricos Tolerancia a la bilis Adhesión a la mucosa Efectos beneficiosos sobre la salud validados y documentados
<b>Fisiológicos</b>	Inmuno-modulación Actividad antagonista frente a patógenos gastrointestinales como <i>Helicobacter pylori</i> o <i>Candida albicans</i> Metabolismo del colesterol y de la lactosa Propiedades antimutagénicas y anticancerígenas

Si bien el grupo más numeroso y profundamente estudiado de bacterias probióticas es el de las bacterias del ácido láctico y bifidobacterias, también se han reportado un importante número de estudios asociados al género *Bacillus* y a las levaduras del género *Saccharomyces*.

#### **I.2.4. Efectos benéficos de los probióticos sobre la salud**

A lo largo de los años, desde los descubrimientos de Metchnikoff, se han atribuido a los microorganismos probióticos propiedades beneficiosas sobre el ser humano, ejerciendo sus efectos a diversos niveles.

Entre los efectos benéficos propios de las bacterias probióticas se pueden citar los siguientes: inhibición de la colonización de patógenos potenciales del intestino, inmuno-modulación, alivio de la constipación, reducción de los problemas asociados con la asimilación de la lactosa, y reducción de la diarrea asociada a antibióticos (revisado por de Vrese y Schrezenmeir, 2008).

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)  $g^{-1}$  o  $ml^{-1}$  al momento de la fecha de vencimiento, sugiriéndose como dosis terapéutica mínima  $10^8 - 10^9$  UFC  $ml^{-1}$  (Shah, 2000; Vinderola y Reinheimer, 2000; Gardiner et al, 2002).

Las evidencias relacionadas al efecto de los probióticos sobre la salud humana se obtienen mediante la realización de estudios *in vitro* e *in vivo*. Los primeros son útiles 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 definitiva. Sólo 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. Mientras que algunos de estos beneficios han sido bien documentados y ensayados en humanos controlados a doble ciego, con grupos divididos de manera aleatoria y con sus correspondientes grupos placebo, otros sólo han evidenciado su efecto y su gran potencial en modelos animales, restando aún su comprobación en humanos.

Por otro lado, es muy importante destacar que estos efectos beneficiosos dependen de la cepa empleada, por lo tanto, no existe una cepa universal que proporcione todos los efectos probióticos beneficiosos, incluso dentro de la misma especie, distintas cepas pueden presentar variaciones en los efectos sobre el hospedador (Vasilijevic y Shah, 2008).

Algunos de los efectos estudiados, pueden ejercer una mayor o menor incidencia dependiendo de la etapa de la vida en que el ser humano se encuentre. En la **Tabla I.3.** se muestran los resultados y beneficios clínicos más frecuentes obtenidos con la administración de probióticos en pediatría, destacándose principalmente la prevención y tratamiento de diarreas y alergias. En la edad adulta la intervención con microorganismos probióticos se ha centrado en el mantenimiento del estado de salud del hospedador, obteniéndose resultados positivos tanto en individuos sanos como con estrés. Finalmente, se han verificado efectos de recuperación nutricional y en el sistema inmunológico, así como una mejora en el alivio del estreñimiento en personas ancianas. En la **Tabla I.4.** se presentan algunas especies probióticas y los efectos sobre la salud que se les adjudican.



**Tabla I.3.** Resultados y beneficios clínicos más frecuentes obtenidos con la administración de probióticos en pediatría

<b>Área de estudio</b>	<b>Beneficios clínicos</b>
Tratamiento de la diarrea	Disminución de la frecuencia Disminución de la duración Reducción del tiempo de hospitalización y de la severidad de los síntomas de la misma
Prevención de la diarrea	Reducción en la incidencia Reducción en la severidad de los síntomas
Diarrea asociada al tratamiento con AB	Reducción de la incidencia y/o severidad de los síntomas
Enterocolitis necrotizante	Reducción de la incidencia y severidad de los síntomas
Prevención de dermatitis atópica	Reducción de la incidencia
Tratamiento de la dermatitis atópica	Reducción de la severidad de los síntomas

**Tabla I.4.** Algunos microorganismos probióticos comerciales y efectos demostrados sobre la salud.

Género	Especie	Cepa	Efecto
<b><i>Lactobacillus</i></b>	<i>acidophilus</i>	La5	Disminuye la diarrea asociada a los antibióticos
	<i>casei</i>	Shirota	Acorta la diarrea asociada a <i>Rotavirus</i> Reduce la recurrencia de cáncer de vejiga. Efecto sobre el sistema inmune
	<i>plantarum</i>	299v	Reducción del colesterol tipo LDL Alivio de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal
	<i>johnsonii</i>	La1	Mejora la acción de vacunas orales Disminuye la colonización por <i>Helicobacter pylori</i>
	<i>reuteri</i>	SD2112	Acorta la diarrea asociada a <i>Rotavirus</i>
	<i>rhamnosus</i>	GG	Acorta la diarrea asociada a <i>Rotavirus</i> Efectos sobre el sistema inmune Tratamiento y prevención de la alergia Alivio de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal
	<i>salivarius</i>	UCC118	Alivio de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal
<b><i>Bifidobacterium</i></b>	<i>breve</i>		Alivio de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal
	<i>lactis</i>	BB12	Tratamiento de la alergia Acorta la diarrea asociada a <i>Rotavirus</i> Disminuye la incidencia de la diarrea del viajero. Mejora la acción de vacunas orales
	<i>longum</i>	BB536	Efectos sobre el sistema inmune Efecto antitumoral en cáncer de colon e hígado
<b><i>Saccharomyces</i></b>	<i>cerevisiae</i>	Boulardii	Disminuye la aparición de episodios en la enfermedad inflamatoria intestinal
<b><i>Propionibacterium</i></b>	<i>freudenreichii</i>	JS	Convierte el ácido linoleico en ácido linoleico conjugado (CLA).

### **I.2.5. Seguridad y estabilidad de los microorganismos probióticos. Aspectos tecnológicos a considerar para su aplicación en alimentos.**

El aislamiento de nuevas cepas probióticas para su aplicación en productos alimentarios requiere una evaluación completa de aquellas características que pueden afectar a su seguridad: propiedades intrínsecas de la cepa (propiedades enzimáticas y metabólicas), farmacocinética (supervivencia, actividad en el intestino, relación dosis – respuesta, etc.) e interacciones entre la cepa y el hospedador. Mientras que las propiedades farmacocinéticas van a estar más relacionadas con la estabilidad de la cepa, las otras dos hacen referencia a la seguridad de la misma (Salminen et al., 1998). Aunque son muchas las propiedades beneficiosas de los microorganismos probióticos, es requisito indispensable que su administración no suponga algún riesgo para la salud del consumidor. Un gran número de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* tienen status **GRAS** (Generally Recognized as Safe) y a otras que han sido empleadas tradicionalmente en los alimentos se las considera Microorganismos de Grado Alimentario (**MGA**), seguros por su ausencia de efectos adversos documentada a lo largo de la historia o por su presencia en la microbiota gastrointestinal humana endógena (Holzapfel et al., 1998; Del Piano et al., 2006). El criterio más estudiado a la hora de seleccionar un microorganismo probiótico es la ausencia de resistencia antibiótica adquirida y, por tanto, transmisible a otros microorganismos.

Los criterios de selección de cepas probióticas candidatas para ser incorporadas en alimentos se fundamentan principalmente en sus **propiedades tecnológicas**, quedando fuera una gran cantidad de cepas con propiedades prometedoras para la salud pero que no satisfacen los requisitos tecnológicos necesarios (Ross et al, 2005; Lacroix y Yildirim, 2007).

En la **Tabla I.5.** se detalla una lista de propiedades de probióticos desde la perspectiva tanto tecnológica como funcional. La evaluación inicial de las cepas para su utilización como cultivos probióticos mediante ensayos tales como la tolerancia al ácido y la bilis, puede proporcionar información útil para la predicción de su desempeño durante el tránsito gástrico. La selección de cepas basada en la tolerancia a determinadas tensiones, tales como ácido y calor, también pueden ser predictores útiles de desempeño tecnológico en alimentos fermentados y deshidratados. (Ross et al., 2005).

**Tabla I.5.** Propiedades tecnológicas deseables de los probióticos (Ross et al., 2005)

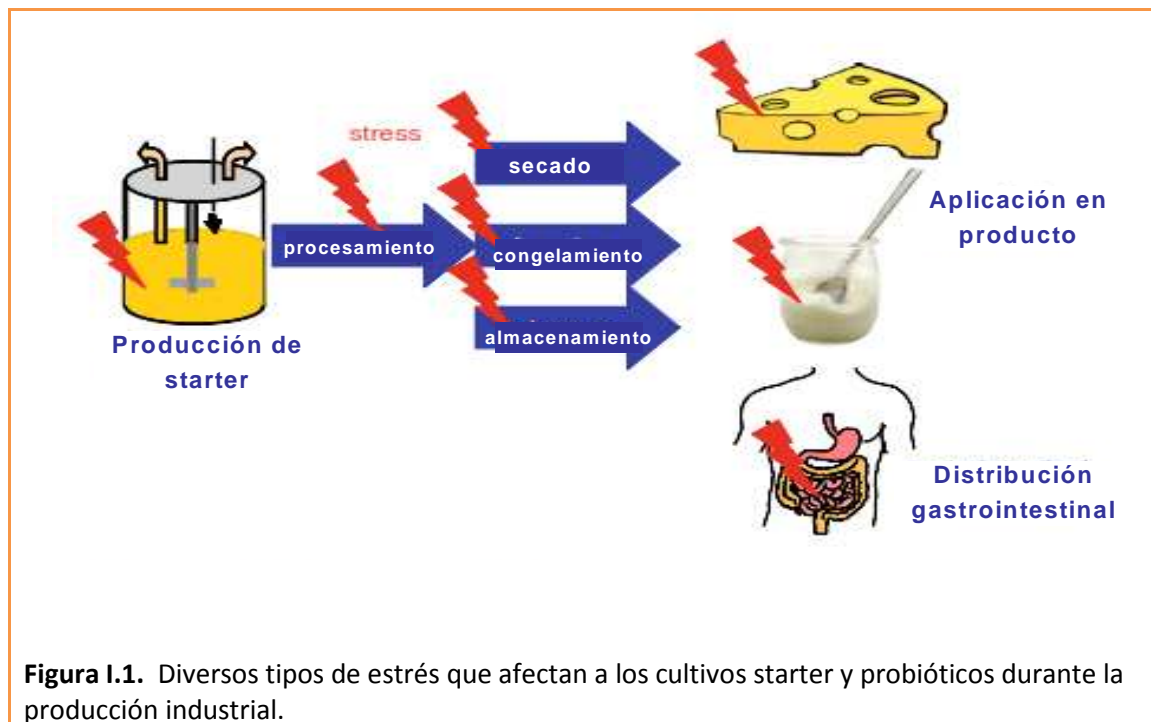
Rasgo Fisiológico
Tolerancia al oxígeno
Tolerancia a ácidos
Tolerancia a la bilis
Tolerancia al calor
Capacidad para desarrollar en leche o medios lácteos
Capacidad para metabolizar prebióticos

Desde un punto de vista tecnológico, resulta conveniente que los probióticos sean capaces de desarrollarse en medios de crecimiento a base de leche. Por otro lado, es necesario que la cepa probiótica sea estable en las matrices alimentarias para poder garantizar su eficacia y su capacidad para inducir en el hospedador los efectos beneficiosos una vez que se encuentra en la formulación final. Para ello, los cultivos probióticos deben ser capaces de soportar las condiciones de procesamiento, retener sus propiedades tras el tratamiento y sobrevivir en cantidad suficiente durante el almacenamiento. Además, la presencia del cultivo probiótico en el alimento no debe

perjudicar la calidad del producto ni alterar sus propiedades sensoriales. (Del Piano et al., 2006).

Muchos son los factores que pueden afectar la estabilidad, viabilidad y funcionalidad de los probióticos, 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 posible interacción con otras especies microbianas (**Figura I.1**). Por estos motivos, las condiciones bajo las cuales los productos que contienen probióticos son procesados y almacenados deben estar muy bien definidas y controladas, a fin de optimizar la viabilidad y funcionalidad de la cepa en el producto final.

Los microorganismos probióticos de las especies *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los más utilizados en alimentos para consumo humano, debido a los beneficios a la salud asociados con su ingesta. Estos microorganismos son considerados seguros (GRAS), tolerantes frente al ácido y la bilis, y capaces de adherirse a las células intestinales.

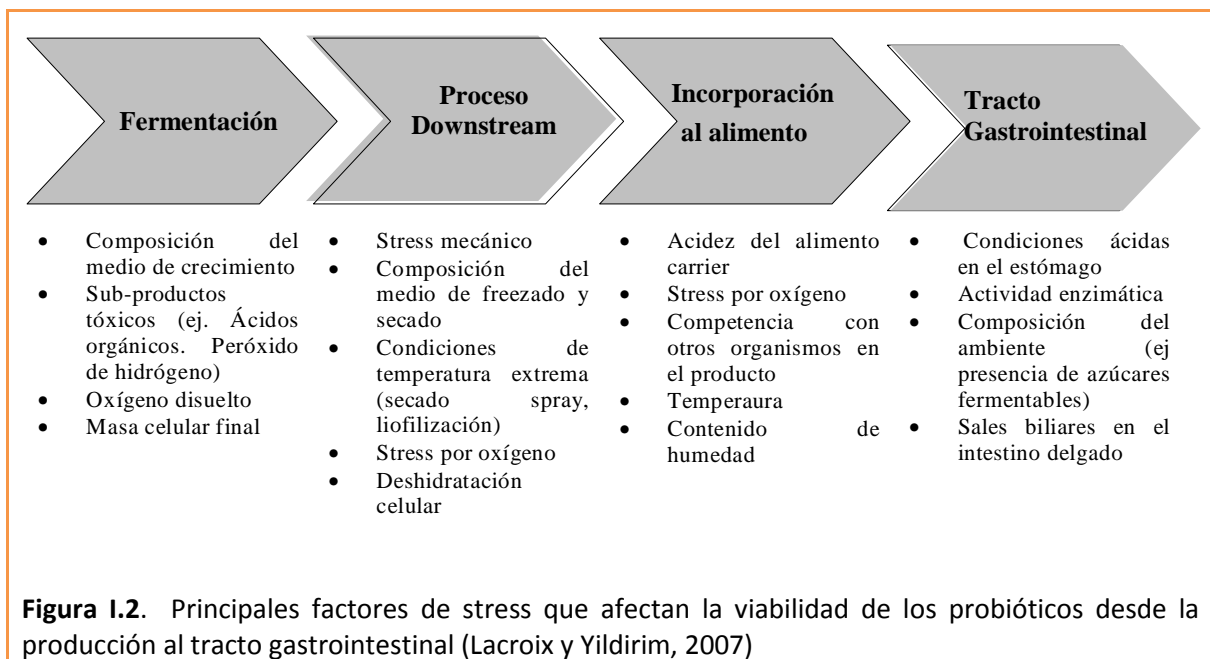


**Figura I.1.** Diversos tipos de estrés que afectan a los cultivos starter y probióticos durante la producción industrial.

A fin de proporcionar un efecto terapéutico los alimentos probióticos deben contener una concentración crítica de bacterias viables por gramo de producto (Ross et al., 2005). Los estudios con células no viables o células-componentes de cepas probióticas también mostraron efectos positivos sobre la salud o efectos inmuno-moduladores (Salminen et al., 1999; Lammers et al., 2003). Sin embargo, el nivel promedio recomendado de bacterias probióticas viables se sugiere que sea al menos de  $10^7$  UFC/g o ml. de producto en el momento del consumo (Corcoran et al., 2008; Talwalkar et al., 2004; Shah, 2000). Otro aspecto a considerar es la regularidad en el consumo de cantidades suficientes del producto alimenticio probiótico a fin de conseguir la "dosis" correspondiente de bacterias vivas en el intestino. Posiblemente dicha dosis se vea modificada en un futuro próximo debido al aumento del conocimiento acerca de la supervivencia de las cepas durante el tránsito gastrointestinal y el efecto terapéutico específico de cada cepa (Champagne et al., 2005). Conseguir un número suficiente de

células viables de probióticos al momento del consumo y en el lugar de destino, sigue siendo un desafío para la industria alimentaria. En consecuencia, es necesario abordar diferentes aspectos tecnológicos relativos al desarrollo de alimentos probióticos.

En la **Figura 1.2.** se enumeran para cada una de las etapas del sistema (fermentación, procesamiento downstream, incorporación al alimento y tránsito gastrointestinal) los aspectos más preponderantes sobre el nivel de células viables en los productos y su actividad en el lugar de destino.



El incremento de alimentos funcionales en el mercado genera un aumento en la demanda por parte de las industrias alimentarias, lo que obliga a desarrollar y probar nuevas tecnologías que permitan un alto rendimiento de células viables en la producción a gran escala. Los inconvenientes más importantes en la propagación y durante el proceso de escalado de numerosas cepas de origen intestinal son la sensibilidad al oxígeno y a las condiciones ácidas. Las tecnologías como la microencapsulación, que garantizan la actividad probiótica y la estabilidad en los productos alimenticios, son de máximo interés. Por lo tanto, la selección de cepas

adecuadas y la mejora de las tecnologías para la producción de probióticos resultan cruciales en el desarrollo de nuevos productos alimenticios probióticos.

### **I.3. Preservación de cultivos probióticos**

Los cultivos lácticos iniciadores y probióticos para aplicación en alimentos son conservados y distribuidos **congelados, liofilizados o deshidratados**.

Los cultivos congelados ocupan gran volumen y deben ser mantenidos a temperaturas bajo cero que causan altos costos de almacenamiento, transporte y energía y por lo tanto, es preferible, la conservación en forma deshidratada (Johnson y Etzel, 1995).

La transformación de las bacterias a una forma deshidratada a través de la eliminación física de agua es una etapa crítica, ya que las bacterias requieren una actividad de agua ( $a_w$ ) de aproximadamente 0,98 en la matriz del producto para la supervivencia y el crecimiento. La preservación de un estado viable requiere  $a_w$  alta para la actividad metabólica o bien baja para sobrevivir en estado latente en los polvos (Paul et al., 1993). El secado de suspensiones bacterianas se puede realizar mediante liofilización o por atomización.

La técnica más utilizada para la deshidratación de las bacterias lácticas es la liofilización. Es un método eficaz para la conservación de productos biológicos ya que no implica una exposición prolongada a tratamientos térmicos severos. La liofilización es ampliamente utilizada para la formulación de cultivos iniciadores y probióticos 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 et al., 2006). El secado por atomización es un proceso energéticamente eficiente y es una de las



herramientas de procesamiento predominante para conservación, ya que puede ser utilizado para producir grandes cantidades de ingredientes lácteos de manera relativamente económica. En comparación, el costo del secado spray es de 5 a 8 veces menor por kilogramo de agua eliminada que el costo de la liofilización.

A pesar de que las condiciones del secado por atomización son restrictivas para los microorganismos (aire de entrada alcanza  $T^{\circ} \geq 180^{\circ} \text{C}$ ), la rapidez de secado combinado con la posibilidad de secar grandes cantidades de cultivos de bacterias ha llamado la atención de la investigación y la industria en los últimos años (Zamora et al., 2006; Chávez y Ledebøer, 2007; Meng et al., 2008).

El método de secado por pulverización utilizado por sí solo no es completamente adecuado para la preservación de bacterias probióticas, y es necesario la incorporación de varias modificaciones relacionadas a la composición bioquímica del concentrado, los parámetros de secado por pulverización y proceso de secado post-spray para mejorar la viabilidad de las BALs en el polvo. Por ejemplo, con las altas temperaturas implicadas en este proceso, se requiere trabajar con especies con un cierto nivel de termo-tolerancia.

Los microorganismos deshidratados con actividad biológica tienen amplias aplicaciones industriales y enorme valor comercial internacional. En comparación con un cultivo líquido, el deshidratado ofrece ventajas de transporte y mejor control de calidad. De acuerdo con su actividad biológica, los cultivos deshidratados se pueden utilizar para la producción de pastillas ó cápsulas de administración oral, cultivos iniciadores para la industria láctea, suplementos funcionales en productos alimenticios y agentes de control biológico, como los biopesticidas y bioconservantes.

### **I.3.1. Procesos tradicionales de deshidratación: liofilización**

La liofilización es un método reconocido hace mucho tiempo para el almacenamiento y preservación de bacterias (Perry, 1998; Carvalho et al., 2004), incluyendo cultivos iniciadores (Sawitzki et al., 2009) y probióticos (Saarela et al., 2005; Kurtmann et al., 2009; Jagannath et al., 2010). En el proceso de liofilización, el agua es removida de la muestra congelada por sublimación del hielo. El proceso consta de tres etapas: congelación, sublimación y desorción (Perry, 1998) obteniéndose al final de las mismas un material concentrado en estado liofilizado. Para preservar la viabilidad celular durante la deshidratación y subsecuente almacenamiento, existen numerosos parámetros que deben ser tenidos en cuenta. En primer lugar hay que considerar que las distintas especies pueden exhibir un comportamiento diferente (variabilidad inter cepa) aún en condiciones comparables (Carvalho et al., 2002; Carvalho et al., 2003c; Carvalho et al., 2003d). Además, el tamaño celular afecta la supervivencia durante la congelación y liofilización (Fonseca et al., 2000).

Carvalho y colaboradores (Carvalho et al., 2003a; Carvalho et al., 2003b; Carvalho et al., 2004) observaron que el medio de crecimiento puede influenciar la viabilidad de numerosas BAL en la forma liofilizada; esto puede ser explicado teniendo en cuenta la protección otorgada por cada medio de cultivo, por ejemplo por acumulación de solutos compatibles. Bajo condiciones de estrés osmótico, se acumulan intracelularmente solutos compatibles que permiten al organismo reestablecer su balance osmótico. Sustancias como sacarosa (Saarela et al., 2005); glicerol (Ming et al., 2009) celulosa (Jagannath et al., 2010); ácido ascórbico y butilato de hidroxitolueno (BHT), glutamato de sodio (Zhao y Zhang, 2009) y otros (Ferreira et al., 1995; Carvalho

et al., 2004, Zhao y Zhang, 2005) han sido reportadas por su efecto protector durante la liofilización y/o el subsecuente almacenamiento en estado deshidratado.

El efecto del medio de secado con o sin la adición de compuestos que incrementen la viabilidad/supervivencia de BAL durante y después del secado ha sido también discutido en la bibliografía (Kets et al., 1996; Carvalho et al., 2004). Reddy et al., (2009) liofilizaron numerosas especies de *Lactobacillus* en tres medios de secado diferentes: lactosa, leche descremada y maltodextrina. Estos autores verificaron que las propiedades probióticas y la viabilidad de las cepas varían significativamente con el medio de secado. La leche descremada es comúnmente usada como medio de secado porque previene el daño celular estabilizando las biomoléculas constituyentes de la membrana celular (Castro et al., 1996), crea una estructura porosa en el producto liofilizado y contiene proteínas que proporcionan una cubierta protectora (Abadias et al., 2001a).

La rehidratación de las células liofilizadas representa también un paso importante. Otros factores *i.e.* fase de crecimiento celular (Carvalho et al., 2004), pH de crecimiento (Li et al., 2009) y temperatura de incubación (Li et al., 2009) pueden también afectar la supervivencia durante la liofilización.

La temperatura de almacenamiento es otro parámetro crítico para la conservación de células liofilizadas (Castro et al., 1995; Abadias, 2001b; Zhao y Zhang, 2009). Los polvos liofilizados pueden ser almacenados bajo vacío, mantenidos en actividad de agua controlada y en la oscuridad.

### I.3.2. Microencapsulación

La encapsulación de componentes bioactivos se puede utilizar para muchas aplicaciones en la industria alimentaria: por ejemplo, para el control de la reacción oxidativa, enmáscarando sabores, colores y olores, extendiendo la vida útil, etc. Estas técnicas cobran cada día más atención, y se utilizan también para intentar proteger a los microorganismos probióticos de los factores que pueden alterar su viabilidad en el producto final, así como también de las condiciones adversas que encuentran en su paso por el tracto gastrointestinal. Dado el tamaño de los microorganismo probióticos (1 – 5  $\mu\text{m}$ ), la técnica aplicada para encapsulación de probióticos es la microencapsulación.

La **microencapsulación** se define como “la tecnología empleada para la envoltura de materiales sólidos, líquidos o gaseosos en pequeñas cápsulas que pueden liberar su contenido a una velocidad controlada bajo determinadas condiciones” (Champagne y Fustier, 2007). La microencapsulación puede proporcionar una barrera física entre el compuesto bioactivo y los otros componentes del producto. Más especialmente, en el campo de los alimentos, la microencapsulación es una técnica mediante la cual las gotas de líquido, las partículas sólidas o compuestos gaseosos están atrapados en películas delgadas de un agente de calidad alimentaria.

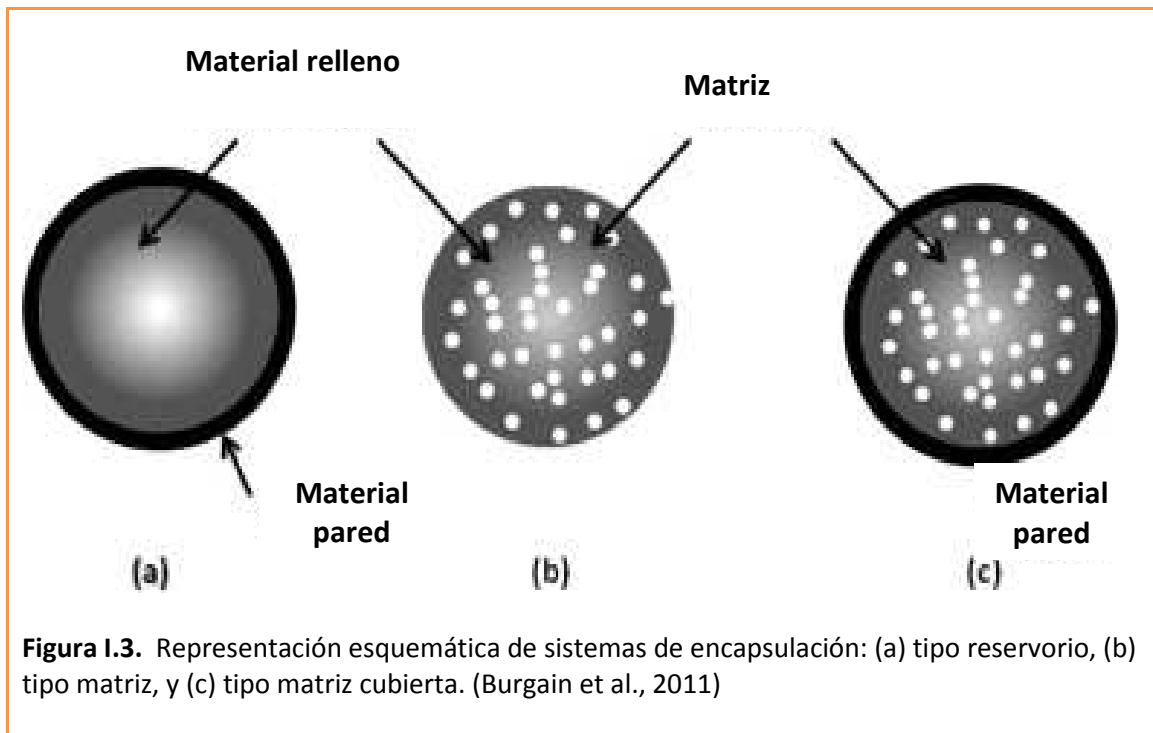
En su forma más simple, una microcápsula es una pequeña esfera con una pared uniforme alrededor de ella. El material dentro de la microcápsula se conoce como el núcleo, fase interna, o de relleno, mientras que la pared se denomina a veces cáscara, revestimiento, o membrana. El núcleo puede ser un material cristalino, una partícula adsorbente dentada, una emulsión, una suspensión de sólidos, o una suspensión de microcápsulas más pequeñas. La microcápsula puede incluso tener paredes múltiples.

En general, sólo "núcleo" y "pared" se utiliza para referirse a la sustancia encapsulada y agente de encapsulamiento, respectivamente. El núcleo puede estar compuesto de sólo uno o varios ingredientes y la pared puede ser simple o doble capa. La retención de estos núcleos se rige por su funcionalidad química, solubilidad, polaridad y volatilidad.

Los diferentes tipos de microcápsulas y microesferas se producen a partir de una amplia gama de materiales de la pared (monómeros y / o polímeros) y por un gran número de procesos de microencapsulación diferentes, tales como: secado por aspersión, pulverización de refrigeración, enfriamiento por pulverización, recubrimiento por suspensión en aire, extrusión, extrusión centrífuga, liofilización, coacervación, separación suspensión rotativa, co-cristalización, atrapamiento de liposomas, polimerización interfacial, inclusión molecular, etcétera. (Shahidi y Han, 1993; King, 1995; Gibbs et al., 1999; Gouin, 2004; Desai y Park, 2005).

La tecnología de encapsulación se ejecuta normalmente en tres etapas: la incorporación del compuesto bioactivo (núcleo) mediante disolución o dispersión (en una matriz líquida) ó aglomeración o adsorción (si la matriz es sólida), la dispersión de la matriz líquida y por último la estabilización mediante procesos físicos (evaporación, solidificación), químicos (polimerización), o fisicoquímicos (gelificación) (Burgain et al., 2011)

Dependiendo de las propiedades físico-químicas del núcleo, la composición de la pared, y la técnica de microencapsulación utilizada, se pueden obtener diferentes tipos de partículas. Como se observa en la **Figura 1.3.**, existen diferentes tipos de encapsulados: **el tipo reservorio y el tipo matriz.**



El tipo reservorio posee una capa alrededor del material del núcleo y por ello se suele llamar también cápsula. En el caso del tipo matriz, el agente activo se dispersa sobre el material de soporte y sobre la superficie. Una combinación de estos dos tipos da un tercer clase de cápsula: la matriz cubierta, donde se recubre el agente activo por un revestimiento (Burgain et al., 2011).

La microencapsulación ayuda a separar el núcleo central, en este caso los microorganismos, de su entorno hasta su liberación, protegiéndolo de diversos factores adversos como la acidez, concentración de oxígeno y condiciones gástricas, mejorando su estabilidad y vida media y proporcionando una liberación controlada dependiendo del material de encapsulación empleado. Es decir que **la encapsulación de probióticos permite proteger las células del entorno adverso, para su liberación en estado viable y metabólicamente activo hasta el momento de su liberación en el intestino** (Champagne y Kailasapathy, 2008; Burgain et al., 2011).

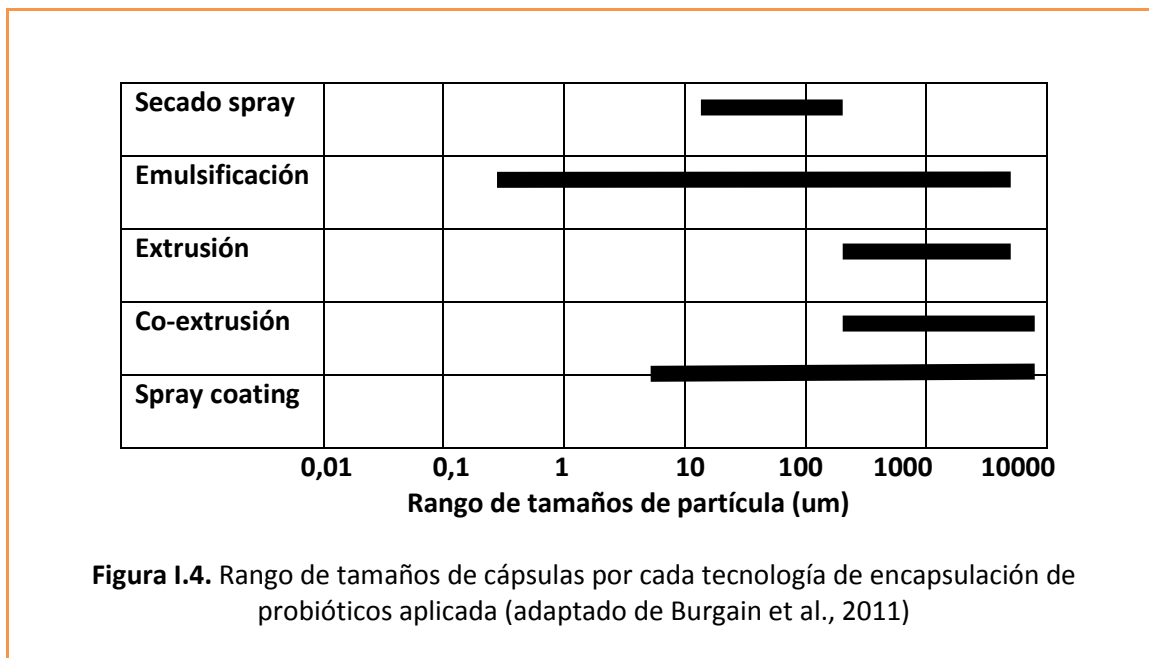
Según De Vos y colaboradores (De Vos et al., 2010) la microencapsulación de diferentes bacterias probióticas sería un paso indispensable para el logro de bacterias con los beneficios para la salud mencionados por las siguientes razones:

- La tasa de supervivencia de probióticos en productos lácteos tradicionales como el yogurt son bajos
- Los probióticos muestran bajas tasas de supervivencia post secado.
- La encapsulación mejora no solo la viabilidad sino que también y de manera muy importante la funcionalidad.
- La liberación controlada es obligatorio para los probióticos

Como material de encapsulación de microorganismos probióticos normalmente se emplean **polisacáridos** de diferente origen: algas marinas (kappa carragenato, alginato), plantas (almidón y sus derivados, goma arábiga), animales (quitosano) o bacterias (galano, xantano); y **proteínas animales (leche, concentrados de proteínas de suero, gelatina)**. Mayoritariamente se emplean polisacáridos ya que constituyen una matriz cuya degradación se ve favorecida por microorganismos de la microbiota intestinal, lo que unido a la protección que ofrecen a nivel del tracto gastrointestinal superior, permite obtener una liberación de los microorganismos en el órgano diana (de Vos et al., 2010).

Las técnicas más utilizadas para microencapsulación de microorganismos probióticos son la emulsificación, la extrusión, el secado por atomización o secado spray (Rokka et al, 2010). Es necesario tener en cuenta dos aspectos cuando se considera la encapsulación de bacterias probióticas: el tamaño de las bacterias (1 – 5  $\mu\text{m}$ ) que excluye las nanotecnologías y el hecho que deben permanecer vivas. En relación al

primer punto, es importante mencionar que cada tecnología de encapsulación genera microcápsulas de diferentes tamaños y tipos. (Figura I.4).



La **emulsificación** se define como un proceso de dispersión de un líquido en un segundo líquido inmiscible. Si se incluye el material a encapsular en el primer líquido, éste se puede encapsular aplicando esta metodología (deVos, *et al.*, 2010). Generalmente se emplean diversos polímeros como material de encapsulación; esta metodología aplicada a los microorganismos probióticos se desarrolla de la siguiente manera: un pequeño volumen de una solución polimérica con células microbianas en suspensión (fase discontinua) es añadido a un volumen mayor de aceite vegetal (fase continua), como aceite de soja, girasol o maíz y la mezcla es homogeneizada hasta formar una emulsión de agua en aceite. Una vez que la emulsión se ha formado, el polímero hidrosoluble ha de ser insolubilizado mediante “crosslinking” o entrecruzamiento para formar las cápsulas dentro de la fase oleosa (**Fig. I.5**). El



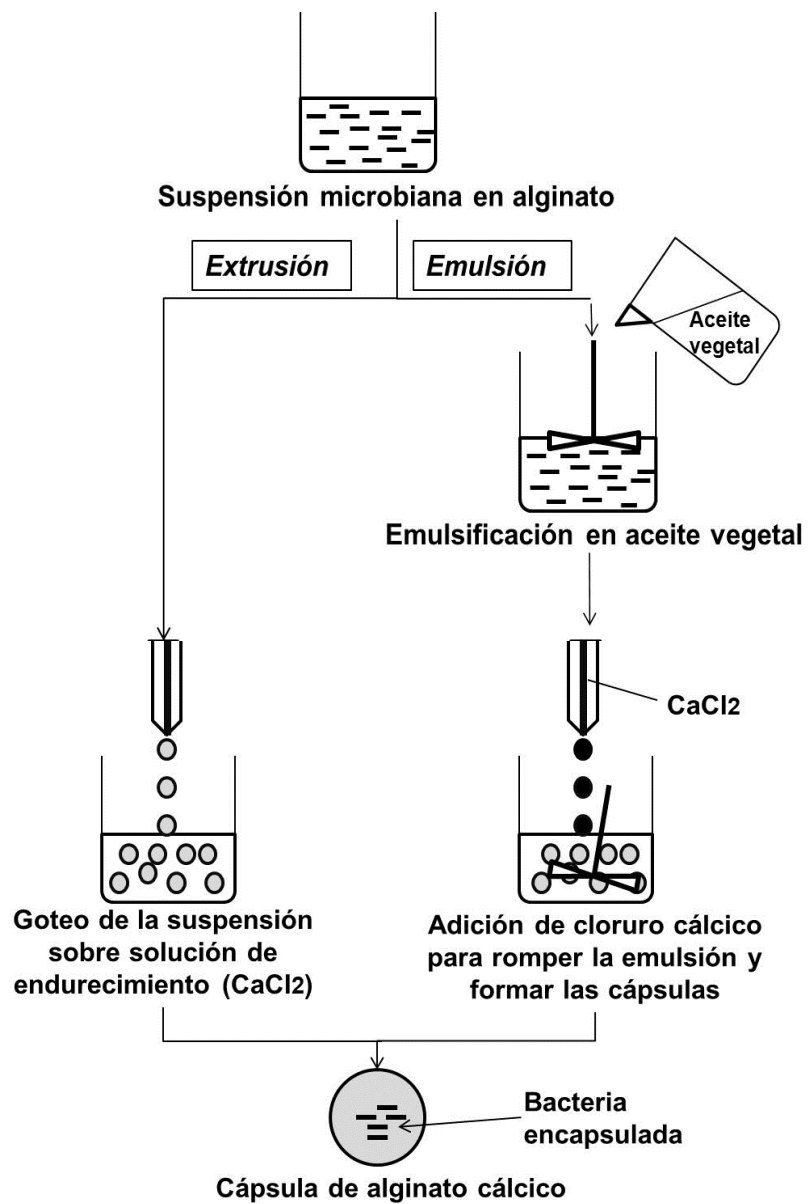
método de insolubilización va a depender del tipo de polímero que se use, por ejemplo, si se emplea alginato se insolubilizará con una solución de cloruro cálcico (Sheu & Marshall, 1993) y si el polímero empleado es el  $\kappa$ -carragenano, se insolubilizará con cloruro potásico (Adhikari, *et al.*, 2003). El tamaño de las cápsulas resultantes puede variar de 20  $\mu\text{m}$  a 2 mm y su tamaño final puede reducirse mediante el empleo de surfactantes como el Tween 80 y reduciendo el tamaño de la fase interna o discontinua.

Esta técnica presenta algunos inconvenientes a la hora de aplicarla en industria alimentaria: por un lado, el aceite residual en las cápsulas perjudica la textura y características organolépticas del alimento y, por otro, el aceite residual, los emulsificantes y surfactantes, pueden ser tóxicos para determinadas células (Kailasapathy, 2002). Además, la necesidad de añadir un paso más al proceso para eliminar estos residuos, junto con el empleo de aceites vegetales, encarecen este método de encapsulación.

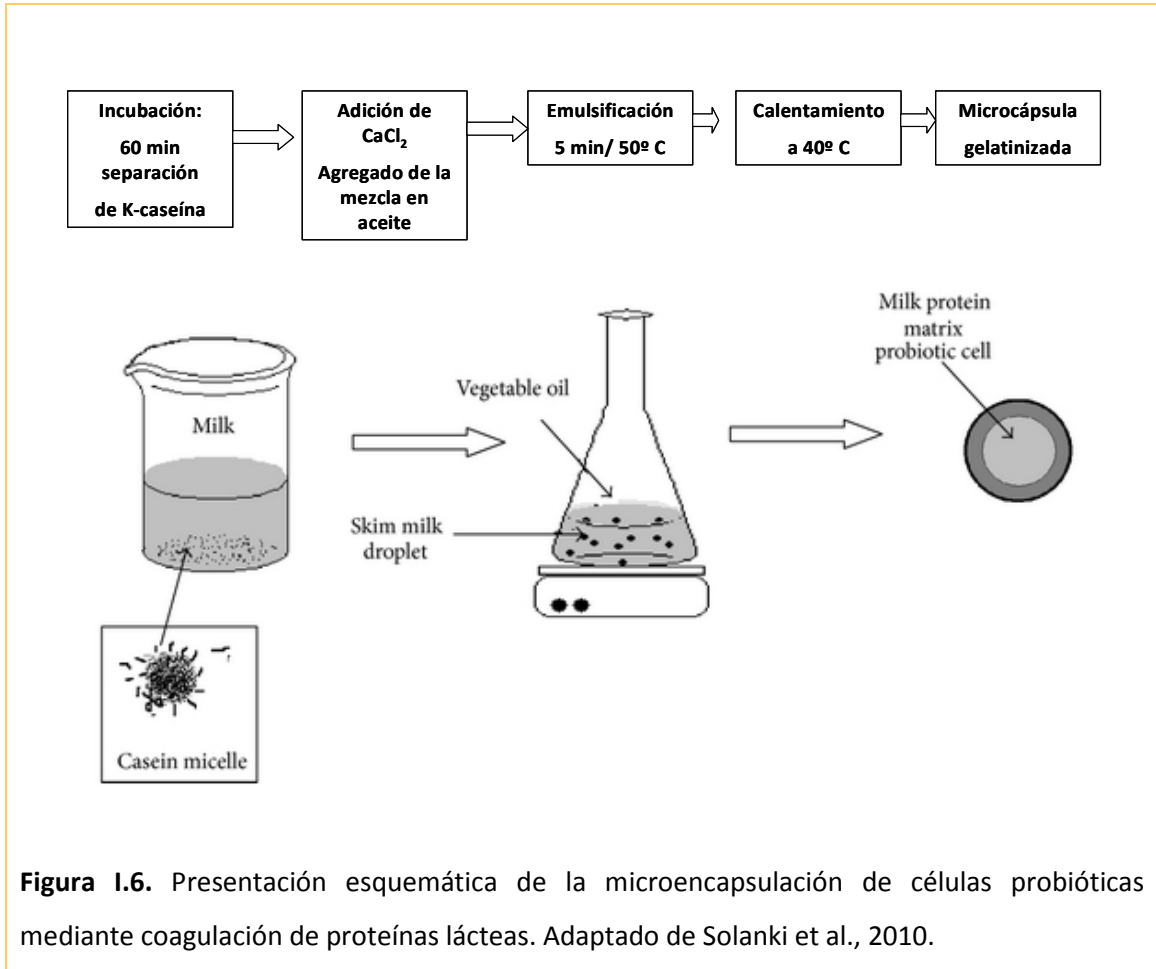
En algunos países, no está permitido el uso de materiales de encapsulación tales como el carragenato o las gomas en los productos lácteos. Por ese motivo, las proteínas lácteas se utilizan para encapsular probióticos por medio de gelificación inducida enzimáticamente (Heidebach *et al.*, 2009; Solanki *et al.*, 2010). Las proteínas lácteas tienen excelentes propiedades de gelificación y son un vehículo natural para los probióticos (Livney *et al.*, 2010; Augustin *et al.*, 2010). Este método genera partículas esféricas e insolubles. En la **Fig. I.6.** se presenta el esquema de la microencapsulación de células probióticas mediante la coagulación de proteínas lácteas. El principio de la técnica está basado en el uso de proteínas lácteas en contacto con coagulante a baja temperatura. Esto permite mantener un sistema líquido donde  $\kappa$ -caseína se separa

por acción de la enzima. Después de eso, las proteínas lácteas se emulsionan en un aceite frío para formar emulsión de agua en aceite. Se produce floculación de las proteínas por inducción térmica y así se generan micropartículas donde los probióticos se dispersan en las proteínas de leche coagulada.

La **extrusión** consiste en producir pequeñas gotas de material encapsulado forzando el paso de una solución a través de una aguja de jeringa o de una boquilla en los dispositivos generadores de goteo (de Vos, *et al.*, 2010). Para ello, los microorganismos son adicionados a una solución hidrocoloide y esta suspensión se hace gotear sobre una solución de endurecimiento, la cual, como en el método de emulsión, va a variar dependiendo del material empleado (**Fig. 1.5**). El tamaño de las cápsulas obtenidas suele rondar los 2-4 mm, y éste va a depender del diámetro de salida de la solución, ya que cuanto menor sea el diámetro de la abertura correspondiente (aguja/boquilla), menor será el tamaño de las cápsulas. Es una técnica apropiada para la encapsulación de microorganismos ya que es poco agresiva, no emplea disolventes perjudiciales para las bacterias, se puede llevar a cabo tanto en condiciones aerobias como anaerobias y, además, empleando los dispositivos adecuados se puede producir a gran escala.



**Figura I.5.** Diagrama de flujo de la encapsulación de probióticos mediante las técnicas de emulsión y extrusión o goteo. Ejemplo realizado empleando alginato como matriz de encapsulación.



**Figura 1.6.** Presentación esquemática de la microencapsulación de células probióticas mediante coagulación de proteínas lácteas. Adaptado de Solanki et al., 2010.

En esta tesis nos centraremos en la tecnología de microencapsulación mediante **secado por atomización o secado spray**.

### **I.3.3 Secado spray. Principios de la tecnología.**

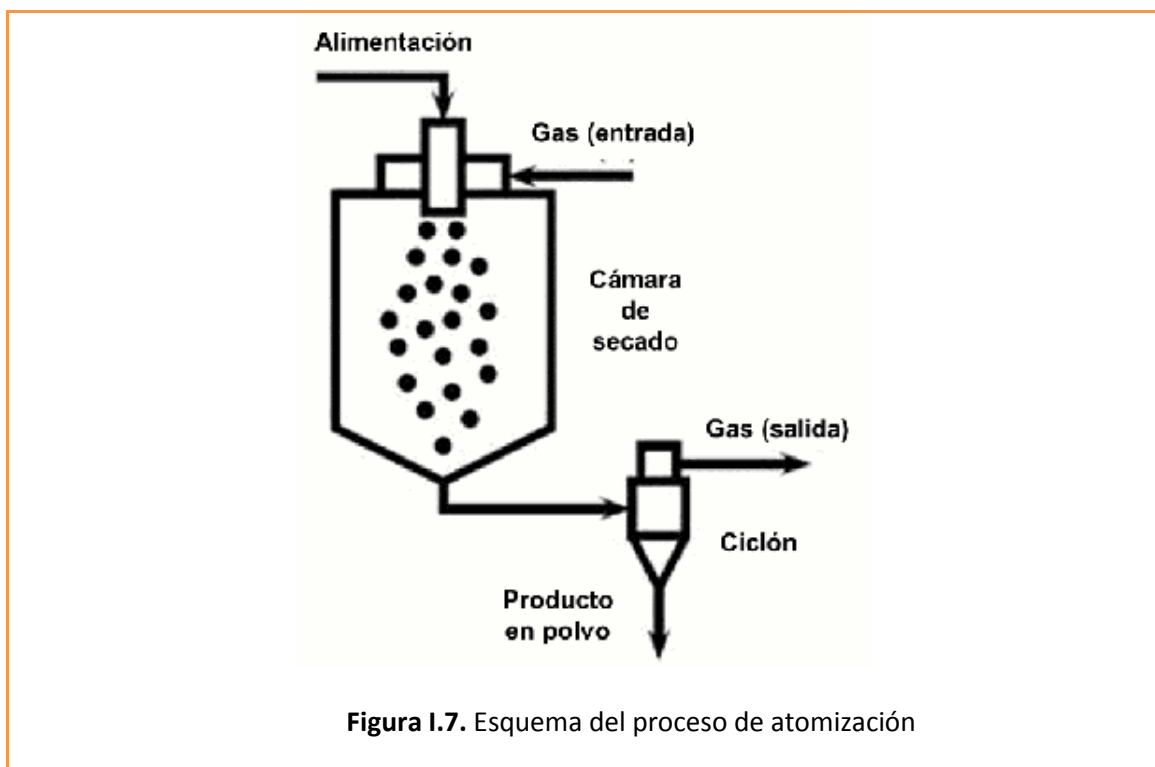
El secado por atomización (*spray drying*) es por definición, la remoción de casi todo el líquido por vaporización, de una solución de sólidos no volátiles (Perry et al., 1985). El proceso de secado por atomización está dividido en tres etapas: la atomización propiamente dicha, el contacto con el aire caliente y la evaporación de la humedad desde la salida de aire, recuperando el producto (Cal y Sollohub, 2010). 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 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). Para todos los tipos de atomizadores, el incremento de la cantidad de energía disponible para la atomización de líquido resulta en aerosoles con menores tamaños de las gotas. El tamaño de las gotas establece la transferencia de calor disponible y por lo tanto, la velocidad de secado (Langrish, 2001).

La etapa final del secado implica la separación del producto y el aire de secado. El producto final consiste en partículas deshidratadas suspendidas en aire, por lo que resulta esencial contar con un eficiente sistema de remoción. El polvo deshidratado es colectado en la parte inferior de la cámara de secado y descargado. La separación del producto del aire de secado puede ser realizada en el interior de la cámara de secado, o alternativamente, en un dispositivo independiente colocado por fuera. Después del

secado en la cámara, la mayor parte del producto deshidratado desciende al fondo de la misma y puede ser descargado desde el fondo o pasar a un ciclón (separador sólido – gas) donde los sólidos son recuperados a partir de una corriente de aire. Los finos que no precipitan son colectados en un filtro de salida (**Figura I.7**).

Las condiciones de operación y secado son seleccionadas de acuerdo a las características del producto a secar y a las especificaciones del polvo que se quiere lograr. Los principales parámetros de calidad para los polvos son el contenido **de humedad residual y el tamaño de partícula**. El contenido de humedad depende principalmente de la tasa de evaporación y de la variación de la temperatura en el secadero (diferencia entre la temperatura de entrada y de salida del aire), que a su vez determina la cantidad de aire necesario y, por ende, el tamaño y costo de casi la totalidad de los componentes del sistema. El requisito del tamaño de partícula afecta a la elección del método de atomización y puede también influir en el tamaño de la secadora.

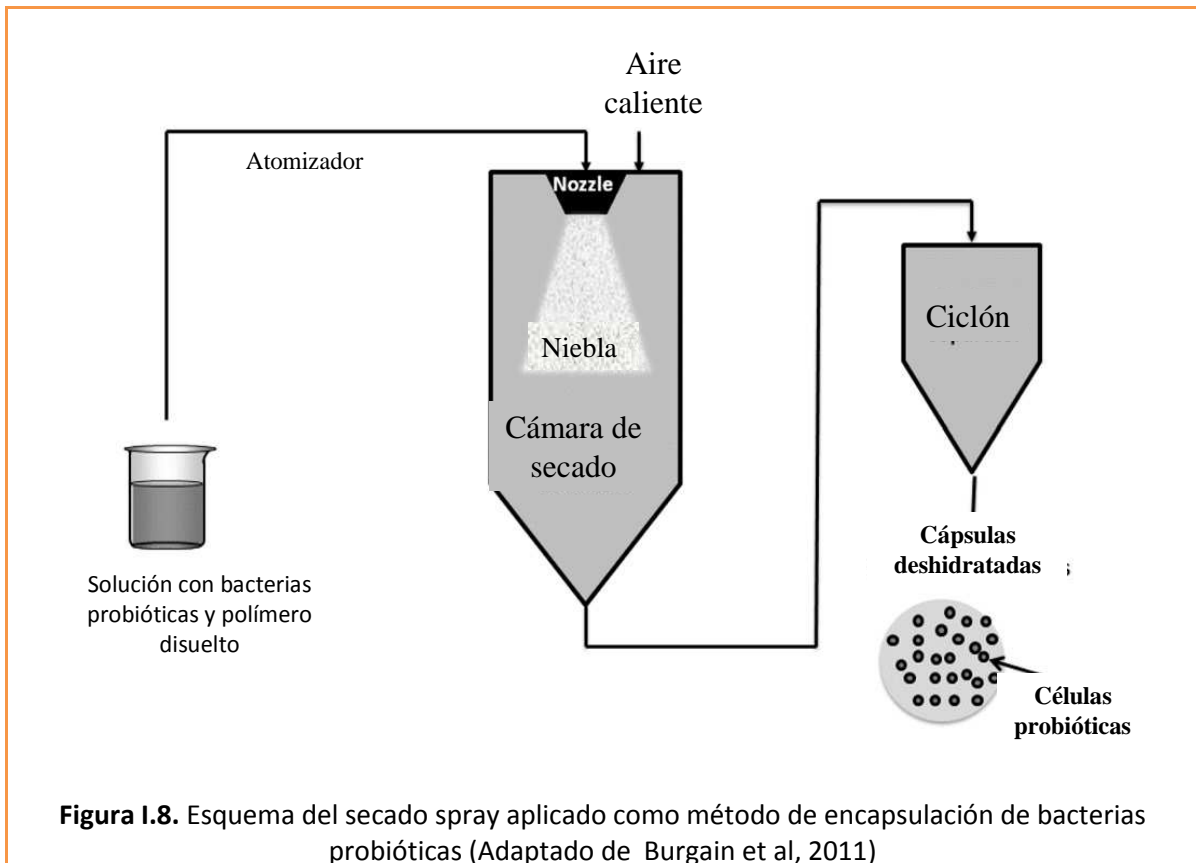


**Figura I.7.** Esquema del proceso de atomización

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, consiguiendo con ello una rápida evaporación del solvente (agua) y poder obtener finalmente los probióticos inmovilizados en forma de partículas de polvo (de Vos et al., 2010) **(Figura I.8)**.

El proceso de atomización es controlado mediante la alimentación del producto, el flujo de aire y la temperatura. Los materiales empleados para la encapsulación, normalmente son polisacáridos, aunque también es posible emplear proteínas, como la leche desnatada (Rokka y Rantamaki, 2010). El secado spray solo acepta dispersiones acuosas, por lo tanto la matriz debe tener una alta solubilidad en agua.

El secado por atomización se caracteriza por ser una técnica rápida, altamente reproducible, apropiada para aplicaciones industriales y cuyos costos de procesamiento son relativamente bajos. La principal desventaja es el empleo de elevadas temperaturas necesarias en el proceso de evaporación del solvente, las cuales pueden afectar la supervivencia de determinadas cepas probióticas (Kailasapathy, 2002; de Vos et al., 2010).



El proceso de secado causa daño a las células y disminución de la viabilidad debido al estrés mecánico y térmico, la presión osmótica, la exposición al oxígeno, y la eliminación de agua ligada (Meng et al., 2008).

La disminución de la disponibilidad de agua en el interior o en las células deshidratadas afecta a la fisiología de las bacterias. La eliminación de agua con el tiempo se traduce en la reducción de la velocidad del metabolismo bacteriano o su detención por completo después de lo cual las bacterias entran en estado latente.

#### I.3.4. Parámetros que afectan la viabilidad celular

Las bajas tasas de supervivencia de cultivos deshidratados por atomización y durante el almacenamiento (Teixeira et al., 1995a; Teixeira et al., 1995b; Teixeira et al., 1995c; Silva et al., 2005a) y las dificultades para rehidratar el producto (Santivarangkna et al.,



2007; Teixeira et al., 1995b) han limitado el uso del secado por atomización en la preservación bacteriana. Durante estos procesos, las bacterias están sujetas a numerosos tipos de estrés, los cuales pueden ser debidos a uno o más eventos diferentes. Los factores que más perjudican la viabilidad durante el secado spray son: el estrés térmico (por las temperaturas elevadas), el estrés osmótico y las fuerzas capilares (por la eliminación de agua), el estrés oxidativo (por el contacto con el oxígeno del aire y el incremento del pH intracelular) y la concentración de sales (por la pérdida de agua) (Santivarangkna et al., 2008; Selmer-Olsen et al., 1999). El daño térmico y por deshidratación de las células son los factores de mayor relevancia.

Los factores que afectan la actividad celular durante el proceso de secado se pueden clasificar en **intrínsecos y extrínsecos**.

Los **factores intrínsecos** son características implícitas de las células y afectan principalmente la **tolerancia al estrés** de las células. Esta tolerancia presenta una gran variabilidad entre especies y puede ser modificada **alterando las condiciones de cultivo incluyendo la fase de crecimiento, la composición del medio y tratamientos de pre – adaptación**.

Los **factores extrínsecos** influyen en la viabilidad celular e incluyen las **condiciones de secado y el carrier utilizado**. Ambos pueden ser optimizados para alcanzar una máxima supervivencia celular.

La baja supervivencia de las BAL y bifidobacterias durante el secado es importante al momento de considerar este método de conservación y exige establecer **estrategias para optimizar la viabilidad celular** (Meng et al., 2008; Santivarangkna et al., 2007).

En los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre la optimización del

secado spray aplicado a los probióticos, tratando de modificar los parámetros del proceso para mejorar los rendimientos de células viables en los polvos **(Tabla I.3)**.

**Tabla I.3.** Tasas de supervivencia para lactobacilos y bifidobacterias durante el secado spray

Microorganism0	Tratamiento	Supervivencia (%) <sup>a</sup>	Tº salida (Tº sal)	Tº entrada (Tº ent)	Solución alimentación	Referencia	Observaciones
<i>L.. acidophilus</i>	Tsal (°C) LPD (25%) LPD (40%)	75, 80, 85 °C <b>8.2, 2.4, 0.5</b> <b>3.7, 0.5, 0.3</b>	75, 80, 85	170	25 % sól. en leche 40 % sól. en leche	Espina and Packard, 1979	Humedad residual (HR) en polvo 3.5 - 6.1%
<i>S. thermophilus,</i> <i>L. bulgaricus</i>		<b>2 - 0.1</b>	60, 70, 80	140 –180	yoghurt, 13,63% sol. no grasos	Kim and Bhowmik, 1990	
<i>L.. helveticus</i>		<b>15</b>	82, 120	220	19% maltodextrina	Johnson and Etzel, 1995	Tº salida ajustada mediante caudal de alimentación. HR aprox. 10%
<i>L. bulgaricus</i> <i>L. bulgaricus</i> NCFB1489		<b>n. i.</b> <b>26%</b>	62-105 80	200 200	Leche descremada 40% maltodextrina en agua o LPD 11%	Texeira et al., 1995	
<i>L. bulgaricus</i>		<b>n. i.</b>	70	200	LPD	Texeira et al., 1996	
<i>L. lactis</i> <i>L. casei</i> <i>S. thermophilus</i>		<b>3.0 – 0.4</b> <b>14.7 – 13.0</b> <b>34 – 5.0</b>	70 – 90	220	25% (p/p) sol. maltodextrina	To and Etzel, 1997	
<i>L. lactis</i>		<b>14.5 – 0.6</b>	68	160 –200	20% LPD	Mauriello et al., 1999	Caudal de alimentación: 10, 13, 17 ml/min

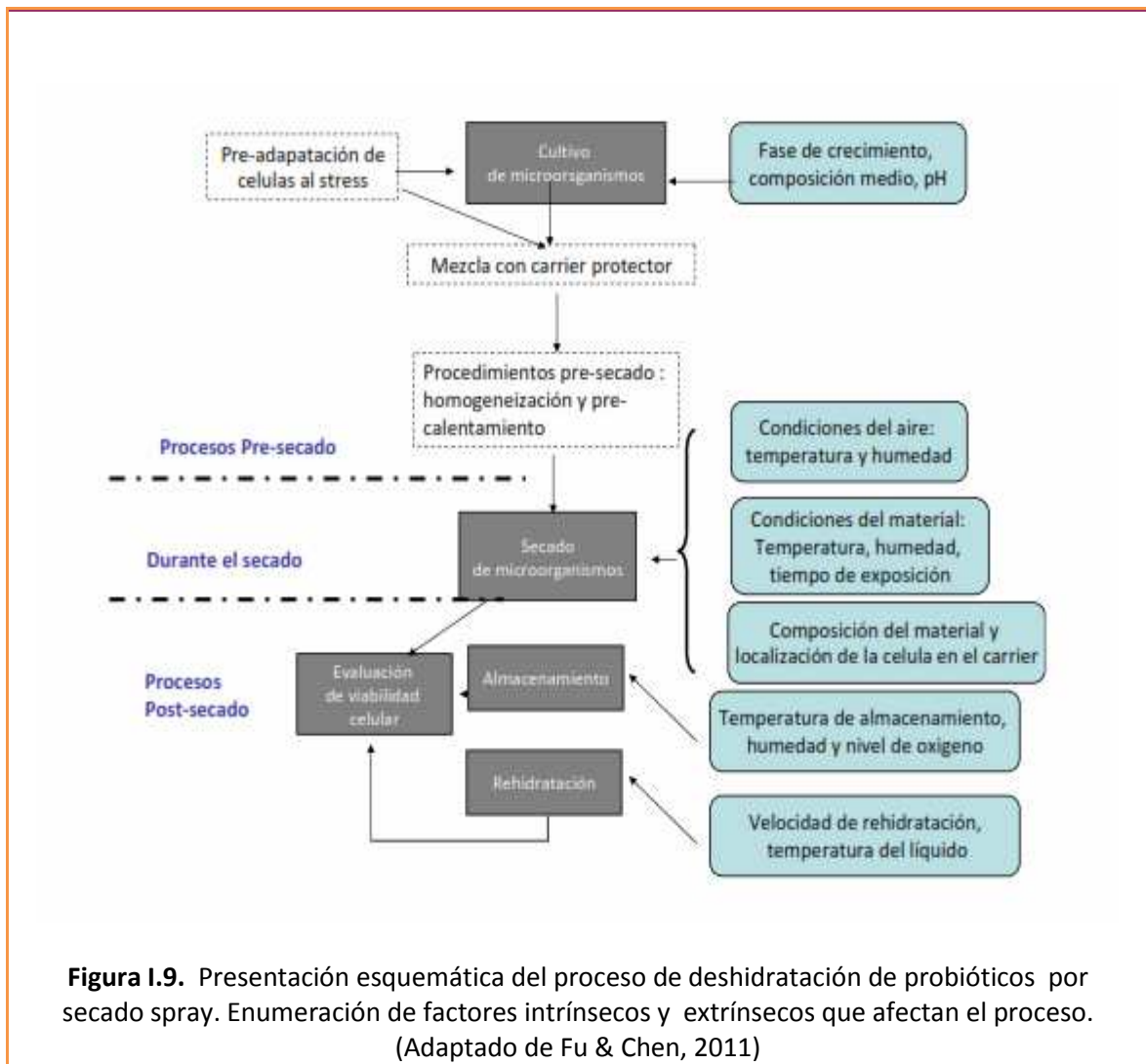
Microorganismo	Tratamiento	Supervivencia (%) <sup>a</sup>	Tº salida (Tº sal)	Tº entrada (Tº ent)	Solución alimentación	Referencia	Observaciones
<i>S. thermophilus</i> <i>L. delbrueckii</i>		54.7 – 51.6 15.8 – 13.7	60 – 80	180	Yoghurt	Bielecka and Majkowska, 2000	Capacidad evaporación de agua 1645 kg/h
<i>L. paracasei</i> NFBC 338 <i>L. salivarius</i> UCC 118		65.0 1.0	60-120	170	20% LPD + 0,5% EL	Gardiner et al., 2000	HR: 8 – 9 %
<i>L. paracasei</i> NFBC 338	Calor: Control Adaptado Sal: Control Adaptado	4 23 7 33	85 – 105	170	Medio de cultivo	Desmond et al., 2001	HR: 1.7 - 3.3 % Tsal. ajustada mediante caudal de alimentación
Bifidobacteria		16.6	45	100	10% (p/v) almidón	O’Riordan et al., 2001	
<i>B. infantis</i> (2 cepas)  <i>B. longum</i> (3 cepas)		82.6 – 0.1	50-60	100	Gelatina, goma arábica, Leche descremada, almidón soluble, 10% LPD	Lian et al., 2002	HR: 7-9% Supervivencia dependiente del carrier LPD> Gelatina> goma> almidón
<i>L. paracasei</i> NFBC 338		84,5 %	68	175	20% LPD	Gardiner et al, 2002	Secado en planta piloto HR 4%
<i>L. salivarius</i> <i>L. sakei</i>		100 41.1	70	200	11% leche	Silva et al., 2002	
<i>L. paracasei</i> NFBC338	Tº sal.(ºC)  20% LPD: 10% LPD + goma:	100 105 ºC  1.7 1.4 0.9 < 0.01	105 100	170ºC	20% LPD o 10% LPD con 10% goma acacia	Desmond et al., 2002	HR: 2.5 - 3.2% Tsal. ajustada mediante caudal de alimentación

Microorganismo	Tratamiento	Supervivencia (%) <sup>a</sup>	Tº salida (Tº sal)	Tº entrada (Tº ent)	Solución alimentación	Referencia	Observaciones
<i>L. acidophilus</i> <i>B. lactis</i> Bb12	Tº ent. 130 °C, Tº sal. 75 °C Lb. acido. B. lactis	<b>1.9</b> <b>72.2</b>	75 – 125	130 – 190	Cellulose acetate phthalate, Glycerol, Maltodextrina, Raftilose, leche	Favaro-Trindale and Grosso, 2002	Tamaño particular promedio : 22 µm
<i>L. rhamnosus</i> GG <i>L. rhamnosus</i> E800 <i>L. salivarius</i>	LPD, LPD + polydextrosa	<b>50,</b> <b>30b</b> <b>25,</b> <b>41b</b> <b>0.7,</b> <b>80.1b</b>	85-90	170	LPD 20% or 10% LPD with 10% polydextrosa	Corcoran et al., 2004	HR: <4%, Tsal. ajustada mediante caudal de alimentación
<i>B. brevis</i> <i>B. longum</i>	B. brevis R070 B. longum R023	<b>25.7</b> <b>1.4</b>	80	160	10 % Proteína de suero	Picot and Lacroix, 2004	HR: B. brevis 2.0% B. longum 2.1
<i>L. bulgaricus</i>		n.i.	70	200	11% LPD	Silva et al., 2004	Sacarosa en medio de crecimiento : Antioxidante para almacenamiento del polvo
<i>S. thermophilus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i>	Tsal. 75 °C B. infantis mixed with - Lb.acido - St. thermo. B. longum mixed with - Lb.acido. - St. thermo.	<b>2.9</b> <b>3.4</b> <b>11.1</b> <b>13.1</b>	60 – 90	100	Leche de soja fermentada	Wang et al., 2004	HR. 4.2 – 10.6 %; Estudio sobre la influencia de cultivos mixtos sobre la supervivencia al secado spray
<i>L. rhamnosus</i> GG	LPD 20% LPD / Polydextrosa LPD/ Raftilosa	ca. <b>65 b</b> ca. <b>55 b</b> ca. <b>65 b</b>	70 – 100	variable	LPD 20% modificada con oligofructosa y polydextrosa	Ananta et al., 2005	HR:2.7–4.5 % Tº sal ajust. cambios en Tent

Microorganismo	Tratamiento	Supervivencia (%) <sup>a</sup>	Tº salida (Tº sal)	Tº entrada (Tº ent)	Solución alimentación	Referencia	Observaciones
<i>Bifidobacterium spp</i>		12 – 102	85 – 90	170	LPD 20% (p/v) o LPD (10%, p/v) y goma acacia (10% p/v)	Simpson et al., 2005	HR: 2.7 – 4.2 %
<i>L. salivarius</i>	<i>BetL+</i> <i>BetL-</i>	1.4 0.3	80 – 85	170	LPD	Sheehan et al., 2006	
<i>L. acidophilus</i>	T ent 120 °C, Tsal 79 °C	1.5	58 – 79	100 –120	LPD, permeado de suero con goma guaraná	Riveros et al., 2009	M.C. 6.3 %
<i>L. rhamnosus</i> GG <i>L. rhamnosus</i> E-97800	MSG., RSM	69, 75 23, 55	60 – 75	variable	Trehalosa (20%, p/v) Suplementada con 12.5 g/l glutamato monosódico (MSG)	Sunny-Roberts and Knorr, 2009	HR: 3.6 – 4.4 %
<i>L. paracasei</i> NFBC 338 <i>S. thermophilus</i> <i>L. bulgaricus</i>		11,8 10 2	80 - 85	170	Yogur fermentado	Kearney et al., 2009	<i>L. paracasei</i> mezclado con fermento de yogur. HR aprox 4%
<i>L. plantarum</i> CFR 2191 <i>L. salivarius</i> CFR 2158 <i>Pediococcus acidilactici</i> CFR 2193		100 100 97	40	140	LPD 10 % (p/p) o maltodextrina 10% (p/p)	Reddy et al., 2009	
<i>Lactobacillus kefir</i> CIDCA 8348 <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 <i>Saccharomyces lipolytica</i> CIDCA 812		2% 10% 0,52%	70 - 85	180	LPD al 11% (p/v)	Golowczyc et al., 2010	aw desde 0,22 a 0,44

<sup>a</sup> Diferentes tasas de supervivencia corresponden a diferentes parámetros de secado spray (ej. Cepas, carrier, temperatura de salida, etc; n.i.:no indicado).

El proceso completo de secado puede ser dividido en **tres fases: pre-secado, secado y post-secado**. El ajuste y optimización de los factores que afectan la supervivencia bacteriana durante cada una de las fases del secado spray se muestran en la **Figura I.9**.



**Figura I.9.** Presentación esquemática del proceso de deshidratación de probióticos por secado spray. Enumeración de factores intrínsecos y extrínsecos que afectan el proceso. (Adaptado de Fu & Chen, 2011)

#### **I.3.4.1. Factores intrínsecos que influyen en la viabilidad**

Para lograr mantener la viabilidad celular es requisito fundamental mantener la estructura celular intacta después del secado y su completa funcionalidad luego de la rehidratación.

La tolerancia al estrés térmico y mecánico es mayor en las bacterias Gram +, que son las de interés comercial. La tolerancia al estrés de los microorganismos varía de especie en especie así como de cepa en cepa. Como resultado de esto, cepas que pertenecen a la misma especie a menudo exhiben diferente comportamiento en el secado. Una cepa con mejor resistencia térmica y osmótica mejora la tasa de supervivencia de 1 a 2 veces después de la deshidratación. Aún para la misma cepa, **la tolerancia al estrés puede ser diferente para células cultivadas en diferentes medios de crecimiento y/o cosechadas en diferentes estadios de crecimiento.** Estos hechos permiten mejorar la tolerancia intrínseca al estrés de las células optimizando las condiciones de crecimiento. Sin embargo, se suma la dificultad del pre-acondicionamiento del organismo a un dado estándar. Por ejemplo en la **Tabla I.3.** se reportan supervivencias que varían del 1% al 80% para la cepa *L. paracasei* NFBC 338. Otras posibilidades para mejorar la tolerancia intrínseca de la cepa al estrés **son la mutación y la pre-adaptación.** Después de la pre-adaptación, la cepa adquiere una mejor tolerancia al estrés pero puede perderse cuando el factor de estrés es eliminado. El uso de mutantes para la producción de microorganismos deshidratados no es recomendable, considerando que la mayoría de ellos son para consumo humano directo o indirecto.

Ya se mencionó que los dos principales mecanismos responsables del deterioro de la viabilidad durante el secado de los cultivos bacterianos son la inactivación por



temperatura y por deshidratación; los mismos ocurren simultáneamente. Sin embargo, el mecanismo de daño inducido por calor y el de daño inducido por deshidratación son diferentes a nivel celular.

Cuando las células son deshidratadas hasta un bajo contenido de agua, los componentes celulares pueden ser afectados. El daño por deshidratación da lugar a la ruptura de la membrana citoplasmática por estrés osmótico y oxidativo. La membrana citoplasmática es el componente más sensible en el proceso de deshidratación, porque hay pérdida de componentes intracelulares.

Teixeira y *col.* (Teixeira et al., 1995b; Teixeira et al., 1995c) han reportado que el daño en la membrana citoplasmática y en la pared celular ocurre como resultado del secado y posterior almacenamiento. El daño térmico actúa sobre la degradación de estructuras celulares esenciales tales como proteínas y ribosomas. Estos daños están relacionados con el calentamiento (Teixeira et al., 1997) y con el proceso de secado (Teixeira et al., 1995c), respectivamente.

El recuento de células viables es un método tradicional para evaluar la viabilidad de las células después de un tratamiento con estrés. Esto permite que las células dañadas pero no letalmente, puedan reparar su estructura y regenerar la capacidad de reproducirse. En un medio rico se reproducen las células intactas y las dañadas. Sin embargo, si el medio es mínimo o se adicionan ciertos compuestos químicos la situación puede cambiar, solo creciendo las células sanas e inhibiendo el desarrollo de las injuriadas. La comparación de los recuentos obtenidos en un medio normal y en un medio selectivo puede considerarse una medida de las células injuriadas subletalmente después de un tratamiento de estrés.

#### I.3.4.2. Factores extrínsecos que influyen en la viabilidad

A fin de mantener la máxima viabilidad antes y después del secado es necesario considerar los siguientes dos aspectos:

- 1) **Optimización del proceso de cultivo celular** para que rinda células con máxima resistencia generada al estrés en el posterior proceso de secado (procesos pre – secado)
- 2) **Minimización de pérdida** celular durante el proceso de deshidratación (Procesos durante y post–secado: alimentación, homogeneización, precalentamiento, atomización y almacenamiento).

##### 1) - Procesos pre - secado

- **Cultivo y pre-adaptación de los microorganismos**

Las bacterias responden a cambios en su entorno mediante una reprogramación metabólica, la cual lleva a un estado celular de resistencia potenciada (Desmond et al., 2001). Teixeira y *col.*, (Teixeira et al., 1994) verificaron que la resistencia puede ser inducida por una dosis subletal de determinados agentes. Las condiciones de cultivo que influyen significativamente sobre la viabilidad celular durante el proceso de secado son: **la fase de crecimiento, la composición del medio y el pH.**

Varios autores han comprobado que las células cosechadas en ***fase estacionaria*** durante un cultivo batch muestran una tolerancia al estrés más alta. Esta mejora es considerada un resultado natural que surge a partir de la respuesta al estrés por la carencia de nutrientes y la acumulación de metabolitos tóxicos durante esta fase.

El efecto de la ***composición del medio*** de cultivo sobre la supervivencia celular durante el secado principalmente actúa influenciando el flujo metabólico de la célula.

Algunos solutos compatibles pueden ser acumulados como productos finales de metabolismo, ya sea por manipulación del flujo metabólico o por generación de un ambiente estresante para inducir una respuesta al estrés. Esta acumulación de solutos en la célula, la protege del estrés osmótico durante la deshidratación. A la vez, ejercen un efecto de protección cruzada con otro estrés tal como el térmico.

La **adición de componentes no utilizables** en el medio de cultivo para inducir una respuesta al shock osmótico también da lugar a la acumulación de solutos compatibles. Este proceso se considera una **pre-adaptación**. Esta pre-adaptación al secado es una herramienta útil para mejorar la tolerancia intrínseca de la célula al estrés. Los productos más utilizados para inducir el shock osmótico son el cloruro de sodio, sacarosa, etc. Se considera pre-adaptación porque compuestos como la sacarosa no son universalmente utilizados por las BAL.

Otro factor relacionado al medio de cultivo que puede considerarse **pre-adaptación** es el **pH**. Respecto a este factor hay resultados contradictorios en la literatura. Algunos autores proponen que trabajar con un pH libre durante el cultivo genera mayores tasa de supervivencia que a pH controlado (Silva et al., 2005). Otros autores sugieren lo contrario (Linders et al., 1997). Estas discrepancias, al igual que las relacionadas al efecto de adición de sal y azúcares sobre la viabilidad post secado, se pueden atribuir a las diferentes cepas y condiciones de secado utilizadas. También es muy importante el material protector empleado durante el secado. Sin embargo, está verificado que la pre-adaptación de las células al estrés osmótico sirve para ejercer un efecto de protección cruzada contra el estrés térmico. Además se estudió la pre-adaptación de las células al calor como inductora de respuesta ante el shock térmico, a fin de

mejorar la supervivencia celular durante el secado spray (Desmond et al. 2001; Desmond et al., 2004).

Algunas veces las aplicaciones industriales requieren una cepa específica que no puede ser reemplazada con una alternativa de mayor tolerancia al estrés. En estos casos la pre-adaptación ofrece una buena oportunidad para incrementar la supervivencia celular contra las condiciones estresantes (Fu y Chen, 2011).

- **Carrier protector para incrementar la supervivencia microbiana**

Las células recolectadas a partir del medio de crecimiento están sujetas a diferentes tratamientos previos a su ingreso secadero, tales como centrifugación, homogeneización, resuspensión de las mismas en un carrier protector y atomización en el spray.

Los carriers se clasifican en tres categorías (líquido, sólido y carrier usado para encapsulamiento celular) de acuerdo a sus estados físicos en el momento de mezclarse con las células. Las células obtenidas del medio de cultivo pueden ser secadas sin material soporte (en forma de pellet o resuspendiendo las células en agua destilada) o bien directamente en el medio de crecimiento. La selección de los diferentes tipos de carrier depende ampliamente del proceso de secado utilizado.

El secado spray requiere la alimentación en forma líquida. La alta concentración de agua permite mantener la temperatura de secado del material cercana a la temperatura de bulbo húmedo, previniendo así el deterioro de las células a causa de las elevadas temperaturas de entrada. Los carriers líquidos tienen dos mecanismos protectores sobre las células. Uno de ellos consiste en actuar como una coraza, aliviando el estrés térmico y osmótico durante el secado así como el estrés osmótico

durante la rehidratación. EL otro mecanismo implica la capacidad de algunos compuestos de reaccionar y estabilizar las estructuras celulares durante los procesos de secado y rehidratación.

La viabilidad de las bacterias probióticas es altamente dependiente del tipo y concentración del carrier usado y varía con la cepa. Existe una concentración por encima de la cual la viabilidad es afectada. Por ejemplo al pasar de 10% a 20% de almidón soluble o goma arábica hay una reducción en la supervivencia. Esto se debe al incremento en los sólidos totales lo que da lugar a partículas de tamaño superior que requieren mayores tiempos de secado con la consecuente inactivación térmica (Peighambardoust et al., 2011)

Algunos de los carriers más utilizados son la trehalosa y la leche descremada en polvo (LPD), debido al efecto protector sobre las células durante el proceso de secado térmico.

La LPD en una concentración entre 10 y 20% es el protector más efectivo de la viabilidad celular durante la deshidratación, particularmente en el secado spray. Se ha sugerido que esta protección se debe a la lactosa (Corcoran et al., 2004; Ananta et al., 2005), ya que interactúa con la membrana celular y colabora para mantener la integridad de la misma de manera similar a otros disacáridos no reductores como la trehalosa o la sacarosa. Sin embargo, Riveros et al. (2009) reportó que al comparar la LPD con permeado de suero, cuyo componente principal es lactosa, la supervivencia de probióticos en idénticas condiciones de secado se redujo a la mitad. En ese sentido, se estima que las proteínas de suero tienen también un rol importante en el efecto protector.

Diversos autores han verificado el efecto protector durante el secado spray de otros compuestos tales como goma acacia (Desmond et al., 2002) y almidón (O`Riordan et al., 2001), entre otros.

El carrier para encapsulación celular difiere del carrier líquido en que es especialmente formulado y durante el secado forma microcápsulas que contiene las células. Algunos de estos carriers están conformados por material de pared o soporte insoluble en agua. Referencia de esto son las formulaciones desarrolladas por Favaro y Grosso (2002) y Oliveira et al. (2007).

La capacidad de los agentes protectores para preservar la viabilidad de las células deshidratadas durante el proceso de desecación ha sido reportada por diferentes autores. La adición de sustratos hidrófilos polihidroxílicos como azúcares se utiliza como compuestos estabilizantes para el mejorar la eficiencia durante el secado y vida útil. Según Chávez y Ledebøer (2007) las combinaciones de una fuente de proteínas con carbohidratos se utilizan para proporcionar una matriz de encapsulación compatible (leche descremada en polvo, maltodextrina, goma arábiga) y un compuesto hidrofílico soluble en agua capaz de sustituir, al menos en parte, la eliminación del agua, o de puentes de hidrógeno y de formar una barrera vítrea (sacarosa, trehalosa, lactosa).

## **2) - Procesos durante el secado**

Para maximizar la supervivencia celular durante el secado térmico es necesario considerar el efecto combinado del daño por calor y por deshidratación, lo que requiere una evaluación balanceada de múltiples factores incluyendo la intensidad y el

tiempo que las células son expuestas a cada estrés, y la velocidad de cambio de dichos estrés (Fu y Chen, 2011).

El grado de inactivación de las bacterias durante el secado spray depende de la **combinación tiempo – temperatura**. El secado spray puede ser dividido en dos períodos: uno a velocidad constante y el otro a velocidad decreciente. En el primero la inactivación térmica está limitada por la elevada velocidad de evaporación y el efecto protector de la temperatura de bulbo húmedo sobre la célula. En el segundo período la superficie de la partícula ya está seca y la temperatura del producto se eleva. En este período el daño térmico depende de la temperatura de salida, del tiempo de residencia y la velocidad de alimentación al spray. Esta segunda etapa es importante para la inactivación térmica, por lo que se debe minimizar el incremento de temperatura en el producto deshidratado y optimizar el tiempo de residencia.

Estudios previos han evaluado el efecto de la temperatura de entrada (O’Riordan et al., 2001), y la de salida del spray (Lian et al., 2002; Sunny-Roberts y Knorr, 2009), y el contenido inicial de sólidos de la solución de secado (Lian et al., 2002; Boza et al., 2004) sobre la tasa de supervivencia post secado. De estos tres factores, **la temperatura de salida del secadero spray** es el de mayor impacto sobre la viabilidad celular en los deshidratados (Boza et al., 2004) y ha sido utilizado para modelar la cinética de inactivación celular (Zhou et al., 2008).

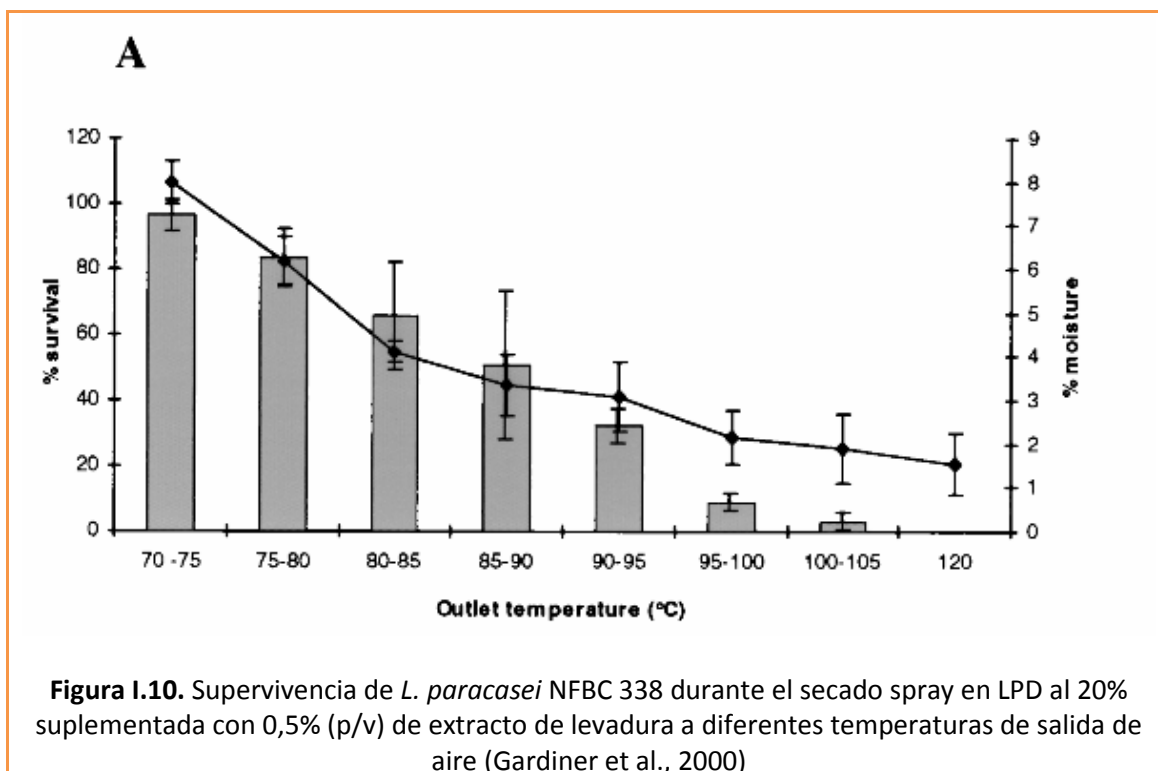
Los parámetros de procesamiento del secado spray son interdependientes ( $T^{\circ}$  de entrada, flujo de aire, caudal de alimentación y % sólidos) e influyen sobre la  $T^{\circ}$  de salida del spray. La definición de estas variables a priori no es sencilla y puede dar lugar a importantes variaciones en la viabilidad de los cultivos.

La temperatura de secado condiciona el  $a_w$  y la humedad del polvo resultante; las mismas deben ser menores a 0,25 y estar entre 3,5 y 4 % respectivamente, para asegurar la estabilidad de los productos durante el almacenamiento. (Meng et al., 2008).

El tiempo de residencia de las gotas en la cámara de secado controla el contenido de humedad de las partículas, así como la supervivencia de los microorganismos en su interior (Santivarangkna et al., 2007).

El efecto de la temperatura de salida sobre la supervivencia celular después del secado es consecuencia del daño térmico. Se acepta generalmente que las bacterias en la partícula seca no están expuestas a temperaturas más altas que la temperatura de salida, lo que constituye el factor crucial para la supervivencia bacteriana en el secado por pulverización (Gardiner et al., 2000; Lian et al., 2002). Consecuentemente, una mejoría en la viabilidad se puede lograr mediante la reducción de la temperatura de salida del spray, pero sin relegar aspectos tecnológicos que condicionan la calidad y estabilidad del polvo tales como la humedad. (**Figura I.10.**)





Considerando sólo el efecto del calor, la inactivación de los microorganismos sigue una función de primer orden:

$$\frac{d(N/N_0)}{dt} = -k (N/N_0) \quad \text{Ec. I.1.}$$

donde  $N$  es el N° de microorganismos (UFC/g) a tiempo  $t$  (h),  $N_0$  es el N° inicial de microorganismos (UFC/g), y  $k$  es la constante de muerte térmica bajo condiciones ambientales de temperatura constante. La constante de muerte térmica tiene relación lineal logarítmica con la temperatura. Por lo tanto, durante el tratamiento térmico los dos factores que tienen efecto directo sobre el N° de microorganismos que sobreviven son la temperatura que determina la constante de muerte térmica y el tiempo ( $t$ ) que las células están expuestas a temperaturas elevadas. La configuración del secadero spray también influye en la supervivencia de las bacterias probióticas.

Chávez y Ledebøer (2007) evaluaron diferentes opciones y verificaron que las mejores condiciones ocurren al secar con toberas en lugar de atomizador rotatorio y con flujo co-corriente de aire y alimentación. Sin embargo, comparando por ejemplo con la selección del carrier, la configuración del spray es de menor relevancia en la supervivencia.

### **3) Procesos post – secado**

Como producto comercial, la estabilidad de la formulación durante el almacenamiento y la viabilidad celular durante la rehidratación y el consumo, son criterios importantes.

Durante el almacenamiento del polvo, la estabilidad microbiana se ve afectada por parámetros tales como la temperatura de almacenamiento, el contenido de oxígeno, la exposición a la luz y los materiales de almacenamiento. Además, el contenido de humedad, la humedad relativa ambiente y la composición del polvo determinan el estado vítreo del medio portador y, finalmente, la viabilidad de los microorganismos durante la vida útil.

El descenso de la tasa de viabilidad celular en la etapa de almacenamiento está muy relacionado con la temperatura a la que se lleva a cabo. A mayores temperaturas de almacenamiento se observó mayor pérdida de viabilidad (Teixeira et al., 1995c; Gardiner et al., 2000; Hernandez et al., 2007; Kearney et al., 2009; Riveros et al., 2009; Strasser et al., 2009; Sunny-Roberts y Knorr, 2009;), mientras que a temperatura de 4 °C podría prolongarse el almacenamiento por un año sin pérdidas significativas de viabilidad celular (Dimitrellou et al., 2008)

La humedad en los productos deshidratados juega un rol clave en el mantenimiento de la actividad celular, siendo los niveles elevados los más perjudiciales (Teixeira et al.,

1995c; Ying et al., 2010). El contenido de humedad está relacionado con la temperatura de salida del spray.

La **temperatura de transición vítrea (Tg)** es la temperatura crítica a la cuál un líquido pasa de un estado gomoso a un estado vítreo. La Tg específica de polvos que contienen azúcares juega un papel importante en la estabilidad de los polvos con microorganismos y depende 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 un efecto estabilizante de los sistemas biológicos (Buitink et al., 2000). En consecuencia, el almacenamiento de cultivos deshidratados a temperaturas inferiores a las temperaturas de transición vítrea de azúcares en las mezclas de polvo aumenta la estabilidad durante la vida útil (Vega y Roos, 2006; Santivarangkna et al., 2008). Se demostró que altas temperaturas de almacenamiento y elevados remanentes de humedad en los polvos perjudican la viabilidad celular, como se ha mostrado para los lactobacilos y bifidobacterias deshidratados en leche descremada (Gardiner et al., 2000; Silva et al., 2002; Zayed y Roos, 2004; Simpson et al., 2005).

Durante el almacenamiento no hay estrés térmico y normalmente, hay bajo contenido acuoso y estrés oxidativo. El daño celular durante el almacenamiento puede ser causado por la oxidación de los lípidos de la membrana. La presencia de ácidos grasos insaturados provoca inestabilidad en la membrana ya que los dobles enlaces pueden ser oxidados, formándose hidroperóxidos citotóxicos (Texeira et al., 1996).

Los efectos perjudiciales sobre la viabilidad celular durante el almacenamiento requieren de tratamientos para mejorar la estabilidad de los polvos de probióticos haciendo del secado por atomización una alternativa rentable frente a la liofilización.

El uso de **carriers protectores y la pre-adaptación** de las células al estrés ejercen sobre las mismas un efecto protector durante el secado y el almacenamiento (Selmer-Olsen et al., 1999; Prasad et al., 2003; Strasser et al., 2009). Esta consistencia implica que el mecanismo de protección tanto para el secado como para el almacenamiento sea similar. El carrier estabiliza la estructura celular y restringe el movimiento molecular, en cambio la pre-adaptación da lugar a la acumulación de solutos compatibles que alivian el estrés osmótico.

Los estudios sobre la optimización de la estabilidad durante el almacenamiento de las bacterias en polvo se centraron en **la suplementación o sustitución del medio portador o carrier** (normalmente LPD) por oligosacáridos o compuestos captadores de oxígeno.

Aunque se cree que los azúcares son los principales componentes que afectan a la transición vítrea, se ha demostrado que los polipéptidos pueden alterar significativamente las propiedades vítreas de los azúcares (Buitink et al., 2000) y por lo tanto, juegan un papel importante en la formación vítrea. Esto podría explicar por qué la leche desnatada en polvo que contiene un gran número de proteínas lácteas es considerada un protector eficiente durante el deshidratado (Hubalek, 2003). La estabilidad de los polvos de lactobacilos secados en LPD suplementada con sustancias prebióticas o polidextrano no mejoró la viabilidad bacteriana durante el almacenamiento en comparación con solo LPD (Corcoran et al, 2004; Ananta et al, 2005).

La adición de **anti-oxidantes** tales como ácido ascórbico y glutamato monosódico a los polvos de *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* almacenados a diferentes temperaturas, mostraron resultados ambiguos y un efecto desestabilizador incluso a 20°C,

concluyendo que **los agentes de protección durante el proceso de deshidratación no necesariamente incrementan la viabilidad de las células durante el almacenamiento** (Crowe et al., 1987).

El incremento de la tolerancia al estrés por parte de las células, ya sea por efecto del carrier protector o de la pre-adaptación, es la razón fundamental del incremento de la viabilidad celular independientemente del mecanismo de inactivación involucrado.

La estabilidad de polvos probióticos también puede mejorarse mediante el uso de **embalajes adecuados**. El uso de material de envasado a base de aluminio que protege al polvo de la exposición a la luz, la humedad y el oxígeno apoya la estabilidad al almacenamiento de los probióticos deshidratados (Nagawa et al., 1988; Ishibashi y Shimamura, 1993). Para el mismo período de almacenamiento, en la conservación de los polvos bajo vacío se obtiene mejor actividad celular que cuando son expuestos al aire (Chávez y Ledebøer, 2007; Hernández et al., 2007).

El periodo de vida útil de las bacterias es cepa dependiente y no se relaciona con la supervivencia durante el secado (Gardiner et al., 2000; Simpson et al., 2005; Sunny-Roberts y Knorr, 2009). Por lo tanto, se debe realizar una cuidadosa selección de cepas resistentes con el fin de lograr cepas con propiedades estables durante su vida útil. Las variaciones de la estabilidad durante el secado y almacenamiento entre cepas de una misma especie puede impedir la posibilidad de extrapolar los resultados a través de subespecies o especies. En consecuencia, los estudios sobre el efecto en la supervivencia al cambiar los parámetros de secado y almacenamiento tienen que ser realizados cepa por cepa.

Resumiendo, se establece que los factores que favorecen la movilidad molecular y el desarrollo de reacciones bioquímicas tienden a influir negativamente en la viabilidad

celular durante el almacenamiento (ej. altas Tº de almacenamiento, alta humedad ambiente y exposición al aire).

En base a lo expuesto, algunos aspectos claves a tener en cuenta para maximizar la supervivencia celular son:

(1) El cultivo en **fase estacionaria** presenta una mejor supervivencia que para la fase log (Teixeira, Castro, y Kirby, 1995c; Corcoran et al., 2004).

(2) La **adaptación previa** de las células mediante un shock térmico u osmótico podría mejorar temporalmente la tolerancia al estrés y mejorar la viabilidad durante el secado y almacenamiento (Desmond et al., 2001; Ferreira et al., 2005).

(3) El uso de **vehículos protectores** favorecen la tasa de supervivencia. Los azúcares no reductores y otros solutos compatibles son protectores eficaces contra el daño por deshidratación (Cerruti et al., 2000.; Zavaglia et al., 2003; Sunny-Roberts y Knorr, 2009). La leche descremada reconstituida es un muy buen carrier o agente de encapsulación para el proceso de secado spray (Gardiner et al., 2000; Lian et al., 2002; Ananta et al., 2005).

(4) En comparación con el secado por atomización, otros procesos que empleen temperatura de secado menores y condiciones de procesamiento más suaves permiten mejorar la supervivencia de los microorganismos (Bayrock e Ingledew, 1997a; Cerruti et al., 2000; Mille et al., 2005; Tsaousi et al., 2008).

(5) En el proceso de secado por pulverización, el uso de una temperatura de salida más alta, lo que implica obtener un polvo con menor contenido de humedad final, da como resultado una mayor tasa de muerte de los microorganismos (Elizondo y Labuza, 1974; Fu y Etzel, 1995; Johnson y Etzel, 1995; Boza et al., 2004).

(6) La pérdida de viabilidad celular durante el almacenamiento es proporcional al aumento de la temperatura de almacenamiento, entre 4 ° C y 37 ° C (Teixeira et al., 1995c; Horaczek y Viernstein, 2004; Wang et al., 2004; Sunny-Roberts y Knorr, 2009).

### **I.3.5. Rehidratación**

Durante la reconstitución de cultivos probióticos deshidratados las células son afectadas por diferentes tipos de estrés por lo que el empleo de adecuadas condiciones de rehidratación es vital para asegurar la máxima viabilidad.

La rehidratación es el último paso crítico en la estabilización de los polvos y las condiciones de revitalización pueden tener una influencia significativa en la recuperación de las células viables ya que las membranas bacterianas son más susceptibles al estrés ambiental (Teixeira et al., 1996). La técnica de rehidratación afecta el número de células viables después de la reconstitución y constituye otro desafío osmótico (Muller et al., 2010).

La humectación de las partículas es el paso que controla la reconstitución y la velocidad de recuperación de las células. La rehidratación lenta bajo condiciones controladas ha demostrado mejorar la viabilidad y maximizar la recuperación celular en comparación con la rehidratación inmediata (Poirier et al., 1999).

Otro parámetro crítico es la temperatura del medio de rehidratación. Se reportó que la temperatura óptima para las BAL que han sido deshidratadas por secado spray es en torno a los 20°C (Wang et al., 2004).

Se ha demostrado que la viabilidad de cultivos rehidratados es cepa dependiente y que influyen sobre la misma el medio de reconstitución, el pH, la temperatura y la osmolaridad (Carvalho et al., 2004; Vega y Roos, 2006).

El medio para rehidratar las células afecta a la tasa de recuperación. Por ejemplo, medios complejos, tales como 10% (p/v) de LPD y medios consistentes en peptona, triptona y extracto de carne afectan positivamente la recuperación en comparación con los medios mínimos tales como el buffer fosfato, glutamato de sodio y agua (Costa et al., 2000). Varios estudios han demostrado que la composición del medio de rehidratación, los agentes protectores y las condiciones de rehidratación (pH, temperatura y osmolaridad) influyen significativamente en la viabilidad celular después de la reconstitución. Por lo tanto, dado que las tasas de reconstitución de probióticos varían entre especies y cepas, se debe identificar separadamente el medio más adecuado y las condiciones óptimas para cada bacteria.

Además del efecto del almacenamiento y la rehidratación sobre la viabilidad celular, hay otros procesos post-secado que pueden tener efecto significativo pero que aún han sido poco estudiados, tales como la forma de dosaje del producto deshidratado. La forma de dosaje final es altamente dependiente de las diferentes aplicaciones de los microorganismos deshidratados. Mientras que en forma de polvo es suficiente para probióticos como un suplemento para leche en polvo, las tabletas o cápsulas para administración oral puede requerir mayor procesamiento a fin de obtener el producto final.

### **I.3.6. Evaluación de supervivencia y actividad de células deshidratadas**

Existe una importante variedad de metodologías para evaluar viabilidad y actividad luego de la deshidratación de los microorganismos. El producto deshidratado con un alto número de microorganismos viables, debe ser preservado y evaluado en el período de almacenamiento y durante la rehidratación.



Los microorganismos deshidratados pueden ser utilizados para diferentes propósitos basados en sus actividades biológicas. La evaluación de la actividad celular post secado necesita considerar la aplicación final de los mismos. Los métodos para evaluar la viabilidad /actividad celular pueden agruparse en tres tipos:

1 - Determinación **de viabilidad celular** basado en su capacidad de reproducirse, mediante recuento de células viables en placa.

2 – Determinación de **actividad metabólica**, por ejemplo: actividad fermentativa y tasa de descenso de pH en la fermentación láctica.

3 – Determinación de la capacidad celular para tolerar ambientes estresantes tales como **tolerancia al ácido y a la bilis**.

La diferencia en el recuento celular en el mismo medio antes y después del secado representa la pérdida celular causada por el secado. Sin embargo, la evaluación de la supervivencia celular en un ambiente desafiante puede ser información valiosa en cuanto a las propiedades biológicas o a la funcionalidad de la cepa después del secado. En un importante número de estudios se realizan pruebas de tolerancia al ácido y a la bilis como criterio de evaluación adicional de las células deshidratadas, ya que ambos estrés están presentes durante el proceso de distribución de los probióticos en el intestino delgado (Favaro - Trindade y Grosso, 2002; Vinderola et al., 2011a).

Para la determinación de actividad metabólica de las células deshidratadas, normalmente se evalúa el desarrollo durante la fase de latencia o fase lag. Las células que sufren un daño subletal necesitan más tiempo para reparar el daño, y comenzar la fase exponencial de crecimiento que las células normales. La prolongación de la fase

lag es una indicación de la atenuación de la actividad celular por el secado (Texeira et al., 1995).

Otros métodos utilizados son por tinción diferencial entre células muertas y viables, basados en la integridad de la membrana citoplasmática. El número de células vivas y muertas puede ser determinado por observación directa usando microscopio con fluorescencia, por medición de la intensidad de fluorescencia utilizando lector o por citometría de flujo. Este último método ha sido utilizado para mostrar una imagen de la relación resultante entre células vivas y muertas posterior al secado (Gardiner et al., 2000).

#### **I.4. Probióticos encapsulados incorporados en alimentos**

Los probióticos se han utilizado incorporados en los productos lácteos fermentados como el yogur y las leches fermentadas. La continua aparición de evidencias clínicas de los beneficios para los consumidores y el poder del marketing han convertido a los probióticos en el ingrediente alimentario funcional con mayor crecimiento en los últimos años (Sloan et al., 2004)

Las industrias de alimentos de todo el mundo están buscando formas de ampliar la gama de alimentos y bebidas adicionadas con estos ingredientes. Sin embargo, incorporar los probióticos en los alimentos y mantenerlos vivos durante su vida útil es un desafío importante para los tecnólogos de alimentos.

Los estudios clínicos atribuyen beneficios para la salud en dosis de probióticos que superan las  $10^8 - 10^9$  células viables por día. Por lo tanto, es muy importante mantener el nivel terapéutico mínimo de microorganismos viables en el alimento

probiótico (se recomiendan  $1 \times 10^7$  UFC/g) para una mejor eficacia en la regulación de los efectos benéficos (Shah et al., 2000; Gardiner et al., 2002; Vinderola y Reinheimer, 2000).

El recuento de probióticos viables disminuye generalmente entre 10 y 100 veces o más, durante el almacenamiento del producto (Mortazavian et al., 2007). A veces se puede lograr un recuento de viables aceptable mediante la introducción de un mayor número de probióticos durante la fabricación (llamado excedente). Si bien el consumo de probióticos en dosis altas es seguro (O'Brien et al., 1999; Salminen et al., 1998) y no parece plantear un riesgo para la salud, en la práctica la adición de un exceso puede ser una propuesta costosa, dado el alto valor económico de los cultivos probióticos como ingredientes. También puede haber limitaciones organolépticas relacionadas a la cantidad de probiótico añadida al alimento. Por lo tanto, hay un fuerte imperativo para mantener la viabilidad de los probióticos en los alimentos durante la producción y su vida útil.

En general, hay cinco aspectos principales a tener en cuenta a la hora de incorporar los probióticos en alimentos:

1. Seleccionar una combinación compatible de cepa probiótica / alimento.
2. Utilizar condiciones de procesamiento del alimento que favorezcan la supervivencia del probiótico.
3. Cuando se requiere fermentación, asegurar que la matriz alimentaria contribuye al crecimiento de los probióticos.
4. Seleccionar una combinación adecuada de producto, envase y condiciones ambientales para asegurar la supervivencia del probiótico en la cadena de suministro y durante el almacenamiento del producto.

5. Asegurarse de que la adición de los probióticos no tenga efectos adversos en el sabor y en la textura del producto.

Usualmente, los probióticos son suministrados por los fabricantes de ingredientes en forma **deshidratada** (liofilizados o secados por pulverización) en concentraciones de  $10^{10}$  - a  $10^{12}$  UFC/g o **congelada** "para adición directa en tina" en concentraciones entre  $10^9$  -  $10^{10}$  UFC/g. Cuando los probióticos se reciben como ingredientes, es importante que se almacenen correctamente según las instrucciones del fabricante a fin de evitar pérdidas rápidas en el recuento de probióticos viables. Para los polvos, esto significa el almacenamiento en frío evitando la humedad, mientras que para los cultivos congelados es importante mantener las temperaturas constantes y evitar repetir el ciclo congelación- descongelación.

Según describe Makinen et al., (2012) las dos posibilidades de producción de probióticos para aplicación en alimentos se ilustran en la **Fig I.11**. En la primera, los probióticos crecen en la matriz alimentaria final sometida a un proceso de fermentación (Ruta B). Un ejemplo típico de este producto es el yogurt (Ruta B2) que contiene simultáneamente la cepa del probiótico, el cultivo starter y los metabolitos de la fermentación secretados en la matriz alimentaria. En estos alimentos fermentados es crítico mantener un balance en el crecimiento de los probióticos para alcanzar la concentración necesaria en el producto sin afectar sus propiedades organolépticas.

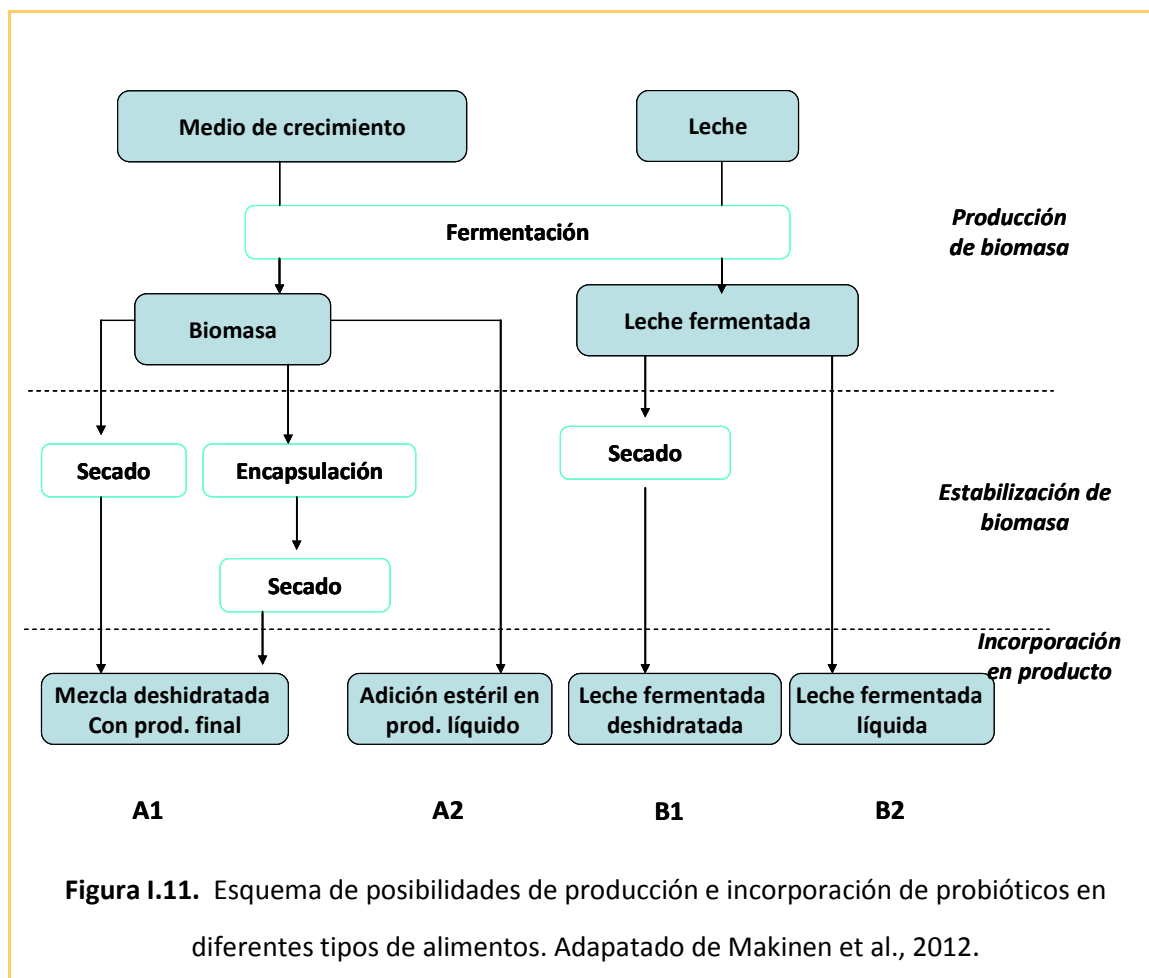
El yogur bebible es el producto lácteo con probióticos más difundido. Sin embargo, se han desarrollado también otros formatos tales como el yogurt probiótico deshidratado o la leche de soja prebiótica (Ruta B1).

La segunda forma de producir probióticos es en un medio industrial previo a la adición en la matriz alimentaria (Ruta A). Esto permite la preservación de los atributos

sensoriales y mantener el objetivo de maximizar el rendimiento de 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 deshidratada con o sin encapsulación previa, seguida por una mezcla en seco en la matriz alimentaria final. Ejemplos de este proceso se dan en fórmulas infantiles, leche en polvo, cereales (Ruta A1). La encapsulación es requerida cuando el probiótico está expuesto a condiciones extremas de secado o almacenamiento.

En el caso de alimentos líquidos no fermentados, el probiótico puede ser adicionado como biomasa líquida concentrada dosificada continuamente en un producto estéril con envasado aséptico (Ruta A2).

De manera similar, la biomasa concentrada de probióticos puede ser dispersada mediante spray sobre piezas de cereal en un secadero de lecho fluidizado. De esta última manera, es posible obtener en un solo paso de secado un cereal cubierto con probióticos estable durante el almacenamiento; mientras que a través del proceso descrito en la Ruta A1, el prebiótico debe ser primero deshidratado y luego mezclado con el producto final.



En los casos de incorporación del probiótico por mezcla en seco ó de dispersión en productos líquido o semi líquidos, los probióticos no se multiplican en el producto y son generalmente añadidos a dosis en el orden de  $10^7$ -  $10^8$  UFC/g. Para un probiótico estándar liofilizado en polvo la adición de  $10^{11}$  UFC /g del probiótico representa el 0,01 - 0,1 % (p/p) del producto final.

En los productos fermentados puede haber algo de crecimiento y aumento del número de probióticos durante la fermentación, lo que permite agregar un menor número de organismos inicialmente (por ejemplo  $10^6$  UFC/g).

La incorporación de células probióticas en toda la gama de alimentos se ve limitada por matrices alimentarias inadecuadas (por ejemplo de bajo pH o con

microorganismos que compiten) y por condiciones de almacenamiento que no son las óptimas. Uno de los principales objetivos de los tecnólogos que trabajan en el desarrollo de alimentos probióticos es asegurar que las pérdidas en la viabilidad de los probióticos se minimicen.

Incluir a las bacterias probióticas microencapsuladas como una barrera física a las condiciones ambientales en los alimentos, es un enfoque que ha sido evaluado usando una gama de materiales y técnicas. La microencapsulación de probióticos debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Los materiales en los que se puede encapsular el probiótico deben ser de calidad alimentaria, de bajo costo, y compatibles con el alimento.
- El proceso de microencapsulación debe ser simple y económico, sin disminuir la viabilidad del probiótico.
- La eficiencia de encapsulación debe ser alta (es decir, cerca del 100% de las bacterias en una suspensión debe ser encapsulado).
- Las microcápsulas deben: contener una alta carga (% v/v) de probióticos, proteger a los probióticos frente a tensiones tales como humedad y el pH bajo ejercidas por el medio ambiente durante la fabricación y el almacenamiento, proteger a los probióticos durante el tránsito gastrointestinal y ser capaces de liberar las bacterias probióticas en el intestino, sitio donde se requiere de la acción de las mismas.
- Las microcápsulas no deben tener un impacto negativo en el sabor y la textura de los alimentos y bebidas (pequeñas cápsulas <30 mm).

La microencapsulación tiene que enfrentar aún muchos retos para su aplicación a escala industrial. Por un lado, los desafíos tecnológicos para obtener microcápsulas

con las mejores propiedades y por el otro, el comportamiento del consumidor hacia los nuevos alimentos. Mediante la microencapsulación se puede lograr una amplia variedad de funcionalidades, consiguiendo incorporar probióticos a diversos tipos de alimentos.

Otro enfoque para mantener la viabilidad de los probióticos a temperatura ambiente durante largos períodos es separarlos físicamente del alimento y del entorno, utilizando diversos dispositivos para la administración de los probióticos. El más simple de ellos se puede lograr manteniendo a los probióticos deshidratados en sobres sellados para ser mezclados con el alimento o la bebida inmediatamente antes del consumo. También, se han desarrollado envases y sistemas de suministro más innovadores para liberar probióticos deshidratados en las bebidas (por ejemplo en la tapa del envase).

Por otro lado, existe también una tendencia creciente en el uso de los probióticos como nutracéuticos disponibles en variados formatos, por ejemplo en cápsulas. Estos cambios de tendencia en los sistemas de provisión de los probióticos pueden reducir la eficiencia funcional debido a la exclusión del potencial efecto sinérgico del alimento.

La dieta es considerada uno de los factores con mayor impacto en la regulación de la colonización de los microorganismos en el tracto gastrointestinal. El alimento ayuda a bufferizar el pasaje de las bacterias a través del estómago y a la vez, puede contener otros ingredientes funcionales que interactúan con los probióticos y alteran su funcionalidad.

Las propiedades fisicoquímicas de los alimentos utilizados como vehículo para la administración de probióticos, tales como la capacidad buffer y el pH, son factores que influyen significativamente en la supervivencia de los probióticos y en el efecto que



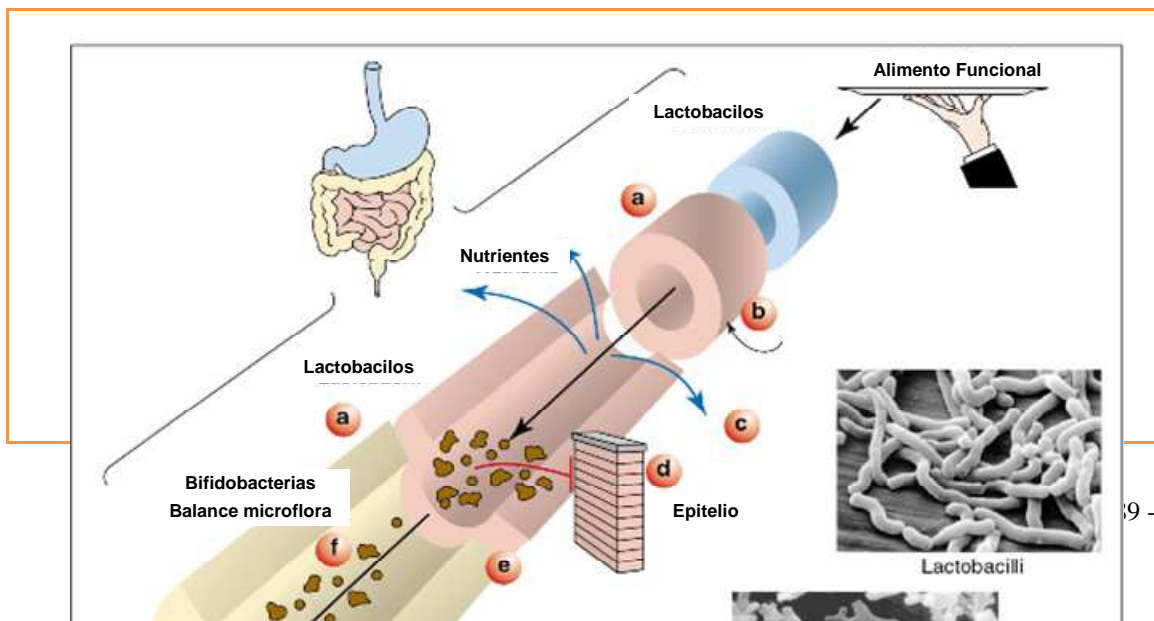
ejercen durante el tránsito gástrico. La formulación del alimento con un rango de pH adecuado y alta capacidad buffer puede incrementar el pH del tracto gástrico y por lo tanto, la estabilidad del probiótico (Kailasapathy K. & Chin J., 2000).

La combinación de probióticos cuyos componentes actúen sinérgicamente y el pH del alimento son las mejores opciones para maximizar la eficiencia probiótica. Por lo tanto, la cuidadosa selección de la matriz alimentaria es un factor importante a considerar en el desarrollo de alimentos probióticos.

La mejora del crecimiento y la supervivencia durante la fabricación, el almacenamiento de los alimentos y su paso por el tracto gastrointestinal, la protección frente a los ácidos, la bilis y las enzimas gastrointestinales, la adhesión al epitelio intestinal, las propiedades antimicrobianas y la resistencia a los antibióticos podrían ser considerados factores relevantes para mantener la eficacia de los probióticos. Sin embargo, la viabilidad de los probióticos es seguramente el aspecto más importante ya que afecta a los demás parámetros mencionados.

El alimento puede influir en el crecimiento, viabilidad y supervivencia, tolerancia al ácido y a la bilis, y en diferentes aspectos de la funcionalidad de los probióticos determinando su eficacia en el tracto gastrointestinal (Ranadheera et al., 2010). (Fig.

I.12).



**Figura I.12.** Efecto de los alimentos funcionales y específicamente los probióticos en el tracto gastrointestinal

- (a) Los probióticos inhiben las bacterias patógenas en la mucosa gástrica y en el intestino.
- (b) Alteran la velocidad y extensión de la digestión de nutrientes
- (c) La presencia, forma y la actividad funcional de los componentes de comida modifican la absorción de nutrientes y factores anti - nutricionales en el estómago y el intestino
- d) Los probióticos modifican las funciones de barrera del epitelio del intestino.
- (e) Los probióticos interactúan y mejoran las funciones de inmunidad gastrointestinal, afectando el sistema inmunológico del cuerpo entero.
- (f) Los probióticos modulan la ecología general de la microflora del intestino.
- (g) Eliminación de productos de fermentación no digeribles

Adaptado de German B. et al, 1999

En la **Tabla I.6.** se presentan ejemplos de alimentos adicionados con bacterias probióticas encapsuladas por secado spray.

**Tabla I.6.** Ejemplos de probióticos encapsulados por secado spray o por spray coating aplicados en diversos alimentos (adaptado de Burgain et al., 2011)

Producto	Probiótico	Material carrier	Referencia
Queso Cheddar	<i>L. paracasei</i>	Leche descremada	Gardiner et al, 2002
Yogurt	<i>L. acidophilus</i>	Maltodextrina +	Su et al, 2007
	<i>B. longum</i>	Goma arábica	
Yogurt	<i>B. breve</i>	Grasa láctea +	Picot and Lacroix

	<i>B. longum</i>	Prot. de suero	(2004)
Bebida deshidratada	<i>B. PL1</i>	Almidón	O`Riordan et al, 2001
Chocolate	<i>L. helveticus</i>	Coating con ácidos	Maillard and Landuyt
	<i>B. longum</i>	grasos	,2008
Chocolate	<i>L. helveticus</i>	Coating	Possemiers et al, 2010
	<i>B. longum</i>		
Prod. Deshidratados (fórmulas infantiles )	<i>B. animalis spp.</i> <i>lactis</i>	GOS, FOS, Glucosa, Inulina	Perez Conesa et al, 2005

El desarrollo de nuevos alimentos funcionales es un reto importante para hacer frente a la expectativa de los consumidores que esperan alimentos beneficiosos para su salud. Sin embargo, aún se necesita mayor investigación científico-tecnológica para optimizar el uso de las células encapsuladas probióticas teniendo en cuenta numerosos factores como la seguridad y la producción sustentable.

## **I.5 Objetivo General**

La finalidad de esta Tesis es desarrollar leche entera en polvo adicionada con bacterias probióticas.

La hipótesis de trabajo planteada considera que la inclusión y supervivencia de bacterias probióticas deshidratadas permitirá transformar a la leche en polvo en un alimento funcional.

Este objetivo se concretará mediante el estudio y evaluación de características biológicas y tecnológicas de cepas probióticas, de metodologías de incorporación de las bacterias al polvo y de estudios de estabilidad durante el almacenamiento.

### **Objetivos específicos**

- ◆ Seleccionar cepas de probióticos según resistencia térmica y factores que condicionan la viabilidad en el producto (características del proceso tecnológico, composición química del alimento vehículo y condiciones de almacenamiento).
- ◆ Estudiar diferentes posibilidades de encapsulación mediante secado spray. Evaluar viabilidad post secado y durante el almacenamiento bajo diferentes condiciones
- ◆ Evaluar la estabilidad y mantenimiento de las propiedades probióticas de los microorganismos seleccionados, frente a las metodologías de encapsulación ensayadas y durante el almacenamiento en la leche en polvo.
- ◆ Caracterizar la funcionalidad a través de ensayos *in - vitro* e *in - vivo* de cultivos probióticos sometidos a secado spray en leche descremada.
- ◆ Realizar pruebas de adición de probióticos en diferentes alimentos

- ◆ Desarrollar una leche en polvo funcional adicionada con probióticos deshidratados.  
Determinar la vida útil de la misma en función al número de bacterias probióticas viables.

## *Capítulo II.*

# *Materiales y métodos*

---



## II.1. Cepas utilizadas en el estudio

Inicialmente se emplearon veintidós (22) cepas de *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. acidophilus* y *L. plantarum*) (**Tabla II.1**) para evaluar tolerancia térmica. Las mismas correspondían a cepas comerciales y a cepas de las colecciones del INLAIN (UNL – CONICET, Santa Fe, Argentina) y al CIDCA (UNLP – CONICET, La Plata, Buenos Aires, Argentina). En base a los resultados de resistencia térmica se seleccionaron cinco (5) cepas probióticas de amplia utilización en productos lácteos (*L. casei* Dan, *L. plantarum* INL, *L. paracasei* A13, *L. plantarum* 8329 y *L. acidophilus* A9) para los ensayos de viabilidad post secado spray. Finalmente, para las pruebas de secado con diferentes matrices y para los ensayos de funcionalidad in vitro e in vivo, sólo se utilizaron tres (3) de estas cepas de lactobacilos probióticos, cuyos nombres comerciales se cambiaron para evitar conflicto de intereses (*L. casei* Dan, *L. paracasei* A13, y *L. acidophilus* A9).

**Tabla II.1.** Cepas utilizadas para el ensayo de resistencia térmica

<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>
<b><i>L. casei y paracasei</i></b>	▪ <i>L.p.</i> 27092
	▪ <i>L.c.</i> Dan
	▪ <i>L.p.</i> 19
	▪ <i>L.c.</i> A15
	▪ <i>L.c.</i> Yak
	▪ <i>L.c.</i> A14
	▪ <i>L.c.</i> Bio
	▪ <i>L.p.</i> A13
<i>L. acidophilus</i>	▪ <i>L.a.</i> 1
	▪ <i>L.a.</i> 5
	▪ <i>L.a.</i> CSL
	▪ <i>L.a.</i> A3
	▪ <i>L.a.</i> A9
	▪ <i>L.a.</i> 08
	▪ <i>L.a.</i> 53
	▪ <i>L.a.</i> CNRZ 1881
<i>L. plantarum</i>	▪ <i>L.pl.</i> INL
	▪ <i>L.pl.</i> 8312 (kefir – Colección CIDCA)
	▪ <i>L.pl.</i> 8329 (kefir – Colección CIDCA)
	▪ <i>L.pl.</i> 8342 (Colección INLAIN)
	▪ <i>L.pl.</i> 335 (Colección Oregón USA)
	▪ <i>L.p.</i> 337 (Colección Oregón USA)

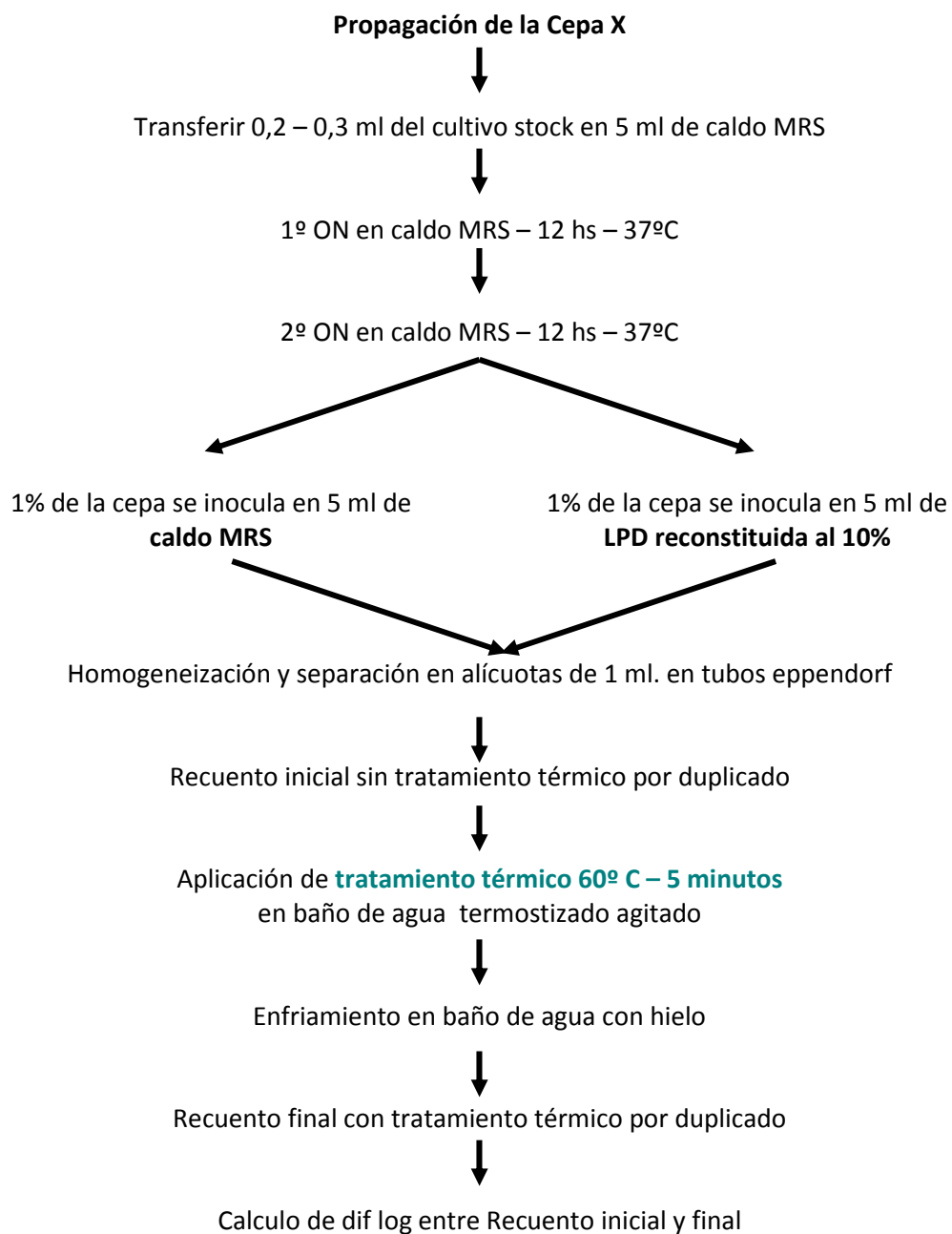
### **II.1.1. Conservación y reactivación de las cepas**

Las cepas fueron conservadas por congelamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$ , utilizando caldo MRS suplementado con glicerol (18% v/v) (Cicarelli, Santa Fe, Argentina) como crioprotector. Para esto, las cepas fueron desarrolladas previamente durante 16-18 hs en caldo MRS a  $37^{\circ}\text{C}$ . Estos cultivos fueron adicionados al 30% a la solución crioprotectora, repartido en alícuotas de 1 ml en crioviales estériles, y luego congelados a  $-20$  y a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las cepas conservadas por congelamiento fueron reactivadas en caldo MRS a  $37^{\circ}\text{C}$  (24 hs), luego reinoculadas en caldo para ser empleadas en los distintos ensayos e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 16-18 hs.



### **II.1.2. Evaluación de resistencia térmica intrínseca de las cepas**

La sensibilidad o tolerancia intrínseca al calor de una cepa es un factor que puede determinar la supervivencia al aplicar el secado spray. Se evaluó la resistencia térmica usando las condiciones sugeridas por Simpson et al., (2005) en cultivos de células overnight cosechadas (6000xg, 15 min, 5°C), lavadas dos veces con solución buffer PBS (pH 7,1) y resuspendidas en caldo MRS o leche descremada en polvo reconstituida al 10% (San Regim, Santa Fe, Argentina). Las suspensiones celulares fueron colocadas en baño de agua caliente a 60° C por 5 minutos e inmediatamente después enfriadas en baño de agua helada. Se realizaron recuentos celulares (Agar MRS, 48 h, 37° C, incubación aeróbica) inmediatamente antes y después de la exposición al calor. En la **Figura II.1.** se presenta el diagrama con el procedimiento aplicado.



**Figura II.1.** Diagrama de procedimiento para evaluación de resistencia térmica intrínseca en las cepas

### II.1.3. Evaluación de pureza de las cepas

A partir del ON se realiza un estriado para comprobar la pureza del cultivo al microscopio con contraste de fases. Se incuba la placa a 37°C por 24 hs. y al sacarla se observa la uniformidad de las colonias y se toma una de estas. Se coloca en portaobjeto y cubreobjeto y se observa al microscopio.



Figura II.2. Determinación de pureza en las cepas

### II.1.4. Identificación de cepas mediante secuenciación del gen 16rRNA

Este procedimiento se ejecutó en el Laboratorio de Microbiología del INLAIN- FIQ – UNL. El análisis se realizó para las tres (3) cepas de lactobacilos probióticos que se utilizaron en las pruebas de secado con diferentes matrices y en los ensayos de funcionalidad in vitro e in vivo. Las cepas *L.a.* A9, *L.p.* A13 y *L.c.* Dan son mantenidas en la colección de cultivos del INLAIN (UNL – CONICET, Santa Fe). Las mismas fueron cultivadas a partir de cultivos congelados (-20°C) e identificadas mediante secuenciación de un fragmento del gen 16 rRNA.

La metodología aplicada fue:

- 1) Observación microscópica de las muestras. Se realizó con contraste de fases (1000x).
- 2) Aislamiento y purificación de cepas. Colonias aisladas de las diferentes placas se cultivaron en caldo MRS (37°C, 24h) y luego se estriaron en agar MRS (37°C, 24h).
- 3) Extracción de ADN. Se extrajo ADN cromosómico de las cepas utilizando el kit GeneElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma, St Louis, MO, USA) a partir de cultivos overnight (37°C, 16h) de las cepas de interés.
- 4) Amplificación de un fragmento del gen 16r RNA mediante PCR. La identidad de los microorganismos se determinó por amplificación y posterior análisis de un fragmento (348 bp) perteneciente al gen 16r RNA, utilizando dos primers universales (Y1 e Y2), basados en regiones conservadas de este gen para células procariotas (Young y col., 1991). Todas las reacciones de amplificación se realizaron utilizando 1 µl (dilución 1:1000) de ADN como templado, 2,5 U de Taq polimerasa (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom), 200 nM de dNTPs (GE Healthcare) y 400 nM de cada primer (Sigma-Genosys, The Woodlands, TX USA) en 50 µl de volumen final, añadiendo un control negativo de reacción (sin ADN). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) bajo las siguientes condiciones: 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 61 °C y 30 seg a 72 °C, incluyendo un paso final de extensión de 7 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5 % en buffer TBE, que luego se tiñeron con GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) y se visualizaron bajo luz UV (Sambrook y Russell, 2001).

5) Secuenciación de los productos de PCR. Los productos de amplificación obtenidos se purificaron utilizando el kit GenElute™ PCR clean-up (Sigma) y su secuencia nucleotídica se determinó por “primer extension” (dos reacciones de secuenciación para cada muestra, una con cada uno de los primers) en el Servicio de Secuenciación de MacroGen Inc. (Seúl, Corea). Los datos de secuencias fueron ensamblados y comparados utilizando el análisis de secuencia del software disponible en el nodo EMBL (CNB, CSIC, España). La identidad de las cepas fue determinada por similitud con las secuencias disponibles mediante la comparación del tipo “nucleotide-nucleotide BLAST” de la base de datos NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

A partir de la comparación de las secuencias nucleotídicas, la cepa 1 fue identificada como *L. acidophilus*, con un grado de similitud de 99%, y las cepas 2 y 3 como *L. casei* o *L. paracasei* (grado de similitud de 100%). Mediante un posterior alineamiento de las secuencias con primers específicos para discriminar entre estas dos últimas especies bacterianas (*L. casei* y *L. paracasei* ; Ward y Timmins, 1999) y teniendo en cuenta resultados previos de RAPD obtenidos en nuestro Instituto, los aislamientos 2 y 3 pueden considerarse como pertenecientes a la especie *L. paracasei*.

**De acuerdo a los resultados obtenidos utilizando metodologías específicas, el microorganismo 1 (A9) pudo identificarse como *Lactobacillus acidophilus* y los microorganismos 2 (A13) y 3 (DAN) como pertenecientes a la especie *Lactobacillus paracasei*.**

## II.2. Deshidratación de bacterias probióticas

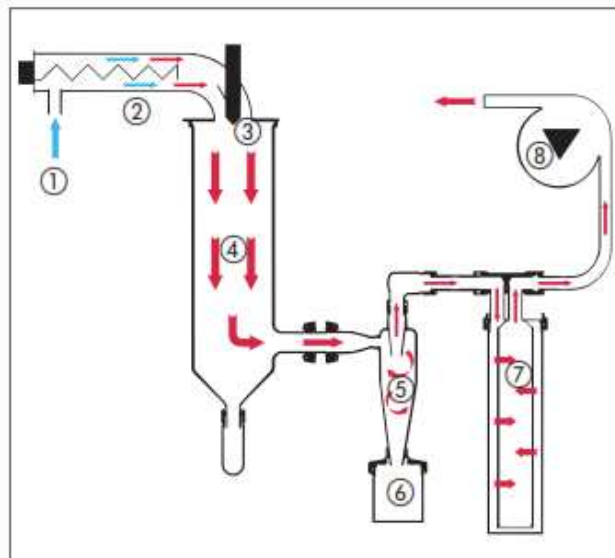
### II.2.1. Secadero Spray

El Mini Spray Dryer B -290 de Büchi es un instrumento a escala laboratorio para llevar a cabo los procesos de secado por pulverización desde 30 ml y hasta 1 litro de agua o solvente orgánico por hora. Gran parte del equipo hasta el recipiente de recogida de polvo es de vidrio haciendo todo el proceso visible. El Mini Spray Dryer B -290 tiene la capacidad de generar partículas de 2 a 25 micras. Las partículas finas se producen debido a la corta estancia de tiempo en un secador de pulverización tan compacto. El tiempo de residencia del aire de secado dentro de la cámara de pulverización es de aproximadamente 1,5 s. La recogida de polvo se realiza en un ciclón, que está revestido internamente con una película antiestática delgada para reducir la adherencia de polvo a la pared de cristal. La separación funciona mediante fuerzas centrífugas en virtud de la inercia de las partículas sólidas.

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. El mismo se observa en la **Figura II.3.** y los diferentes componentes del mismo en el diagrama de la **Figura II.4.** 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. El rendimiento de evaporación del equipo está sobre 1 l/h de agua.



**Figura II.3.** Mini Spray Dryer Büchi B-290 – Suiza



- ① Boca de aspiración  
(Accesorio opcional: filtro de entrada véase capítulo 8)
- ② Calefacción eléctrica
- ③ Entrada de la corriente estabilizada en la cámara de secado
- ④ Cilindro de pulverización
- ⑤ Ciclón para separar el producto de la corriente de aire
- ⑥ Recipiente de recogida para el polvo seco
- ⑦ Filtro de salida
- ⑧ Aspirador para generar la corriente de aire

**Figura II.4.** Componentes del Mini Spray Dryer Büchi B290. Principio de funcionamiento de la corriente según el principio de flujo paralelo (producto pulverizado y aire seco se desplazan en el mismo sentido)

### II.2.2. Descripción del proceso de pulverización

El trayecto del aire de secado en el secadero es el siguiente: el aire frío es aspirado a través del túnel de entrada (1) y luego calentado eléctricamente (2) antes de la atomización de la solución de alimentación por la tobera de dos fluidos (3). La alimentación dispersada entra en el cilindro de pulverización (4), en el que se lleva a cabo el secado de las gotitas en partículas sólidas. El polvo seco se separa de las partículas finas en el ciclón (5) y se recoge en el recipiente de vidrio (6). El filtro de salida (7) se coloca en serie con el ciclón para eliminar las partículas finas y para impedir su entrada aspirador (8) que genera el flujo de aire. Las temperaturas se miden en la entrada del cilindro de pulverización (temperatura de entrada) y en la pieza intermedia entre el cilindro de pulverización y el ciclón (temperatura de salida).

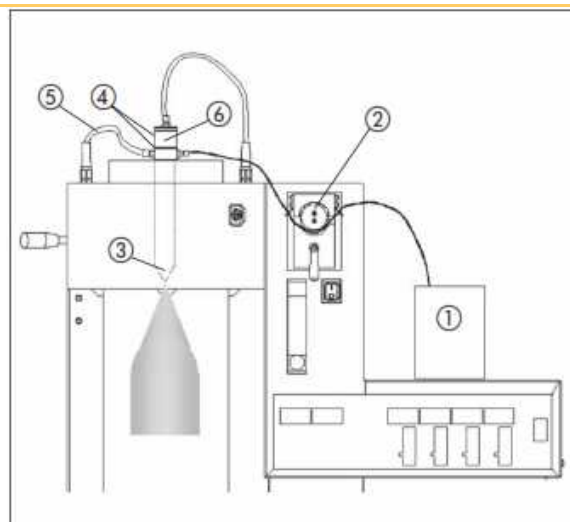
Uno de los aspectos fundamentales del secado, es la atomización. El Mini Spray Dryer B-290 dispone de una tobera integrada para dos fases para pulverizar la solución de partida (**Figura II.5**). Al suministrar aire comprimido, el líquido de la alimentación se dispersará en finas gotitas que se secan en el cilindro de pulverización.

El trayecto de la solución de alimentación y del aire a presión en el secadero spray en el modo co-corriente es el siguiente: ingresa la solución de alimentación (1) transmitida por la bomba de alimentación peristáltica (2) y el aire de atomización (5, temperatura de entrada) por separado al cabezal de la tobera (3), donde se lleva a cabo la atomización de la solución de alimentación en finas gotitas. La tobera de dos fluidos en co-corriente se encuentra en el centro de la parte superior del cilindro de pulverización. La atomización se genera por el aire caliente comprimido a una presión de 5 – 8 bar (**Figura II.6**).





**Figura II.5.** Tobera de dos fases del Mini Spray Dryer Büchi B290



- ① Solución de partida
- ② Bomba peristáltica de alimentación
- ③ Tobera de pulverización para dos fases
- ④ Conexión para agua de refrigeración
- ⑤ Conexión para aire comprimido o gas inerte
- ⑥ Suplemento para la limpieza de la tobera

**Figura II.6.** Componentes del Mini Spray Dryer Büchi B290. Principio de funcionamiento del desarrollo del producto y de la tobera de pulverización

### II.2.3. Parámetros del proceso

El secado por pulverización es un método en el que el resultado depende fuertemente de las propiedades de la solución de secado. Las condiciones utilizadas para el secado por atomización (caudal del líquido de entrada, temperatura y humedad del aire de entrada, caudal de aire de secado y la aspiración) van a influenciar sin lugar a dudas las características del producto en polvo obtenido (humedad final del producto, rendimiento de producción, temperatura de salida y tamaño de partícula).

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 nos indicará el caudal de aire utilizado para el atomizado. Este caudal de aire lo utiliza una tobera de dos flujos.

- **Temperatura y humedad del aire de entrada al cilindro de atomización**




















**(T° inlet).** 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.

La optimización de estos parámetros se hace inicialmente en un proceso de “ensayo y error”, si bien es posible predecir la influencia de cada una de estas variables de manera

individual. La influencia de cada una de estas variables en el secado por atomización se presenta en la **Tabla II.2.** (Büchi B-290 Manual del usuario).

**Tabla II.2.** Influencia de las variables del secado por atomización (Büchi B-290 Manual del usuario)

<b>Parámetro /Dependencia</b>	<b>Caudal alto del aire de secado</b>	<b>Humedad del aire de entrada alta</b>	<b>Temperatura de entrada elevada</b>	<b>Caudal de aire de atomización alto</b>	<b>Caudal del líquido de entrada alto</b>	<b>Alta concentración de solutos a atomizar</b>
<b>Humedad final del producto</b>	Mayor humedad porque baja la presión parcial del agua evaporada 	Mayor humedad del producto porque hay una presión parcial más alta del aire de secado 	Menor humedad porque el aire de entrada tiene menor humedad relativa 	No afecta	Mayor humedad porque más agua conduce a una presión parcial más alta 	Menor humedad porque habrá menos agua para evaporar, menor presión parcial 
<b>Rendimiento de producción</b>	Mayor rendimiento en la separación en el ciclón 	Menor rendimiento porque más humedad puede conducir al pegado del producto 	Mayor rendimiento porque se evita la eventual pegajosidad 	No afecta	Depende de la aplicación 	Mayor rendimiento porque partículas más grandes conducen a una mejor separación 
<b>Temperatura de salida</b>	Mayor temperatura de salida porque hay menos pérdidas de calor basadas en la entrada total de energía 	Mayor temperatura porque hay más energía almacenada en humedad 	Mayor temperatura de salida pues hay una proporción directa 	Más cantidad de aire fresco que tiene que calentarse 	Menor temperatura porque se evapora más cantidad de agua 	Mayor temperatura porque es menor la cantidad de agua evaporada 
<b>Tamaño partícula</b>	No afecta	No afecta	No afecta	Disminuye el tamaño porque aumenta la energía para la dispersión del fluido 	Mayores partículas porque hay mayor cantidad de fluido a dispersar 	Mayor tamaño de las partículas secadas pues hay mas producto 

### **II.3. Procedimiento aplicado para deshidratación de bacterias probióticas por secado spray**

Para la definición de las condiciones de secado spray de bacterias probióticas se consideraron los antecedentes publicados como hojas de aplicación por el proveedor del equipo Büchi (**Figura II.7**), y trabajos previos de varios autores (Gardiner et al., 2000; Gardiner et al., 2002; Ananta et al., 2005).

Se realizaron tres repeticiones independientes para cada cepa. Los polvos fueron envasados al vacío en sobres individuales y sometidos a los diferentes análisis y pruebas correspondientes. En la **Figura II.8.** se presenta el diagrama con el procedimiento aplicado.

<p><b>BÜCHI Mini Spray Dryer B-290</b> <b>Application Note</b></p> <p><b>Lactobacillus paracasei (1)</b></p> <p><b>General Information</b>            Product category: Food, Microorganism, Bacteria, Food supplement            Type of application: Spray drying            Industrial sector: R&amp;D, Food            Applied device: BÜCHI Mini Spray Dryer B-191            Recommended device: BÜCHI Mini Spray Dryer <b>B-290</b></p> <p><b>Sample Preparation</b>            Solid concentration: 20% w/v, CFU 2.25*10<sup>9</sup>/g            Solvent: Water, Reconstituted skim milk            Carrier, Filmogen: 20% w/v reconstituted skim milk (RSM)</p> <p><b>Spray Drying Process Parameters</b>            Inlet temperature: 100°C            Outlet temperature: 95 - 100°C            Pump rate: -            Gas spray flow: -            Drying gas flow: -            Nozzle diameter: -</p> <p><b>Results</b>            Particle size: 0.5 - 3 micron            Morphology: -            Yield: -            Encapsulation efficiency: -</p> <p><b>Additional Information</b>            Journal Paper, Year: Appl. Environ. Microbiol., Vol. 72, No. 7, p. 5104-5107 (2006)            Title: Enhanced Survival of GroESL-Overproducing Lactobacillus paracasei NFBC 336 under Stressful Conditions Induced by Drying Spray- and freeze-dried cultures overproducing GroESL exhibited 10-fold and 2-fold better survival.            Remarks:            Corresponding author: B.M. Corcoran, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, P. Dockery and C. Stanton, cstanton@moorepark.teagasc.ie            University/Institution: Teagasc, Moorepark Food Research Centre, Fermoy, County Cork, Department of Microbiology and Department of Anatomy, University College in Cork and Alimentary Pharmabiotic Centre, Cork            Country: Ireland</p>	<p><b>BÜCHI Mini Spray Dryer B-290</b> <b>Application Note</b></p> <p><b>Lactobacillus paracasei (2)</b></p> <p><b>General Information</b>            Product category: Food, Microorganism, Bacteria, Food supplement            Type of application: Spray drying            Industrial sector: R&amp;D, Food            Applied device: BÜCHI Mini Spray Dryer B-191            Recommended device: BÜCHI Mini Spray Dryer <b>B-290</b></p> <p><b>Sample Preparation</b>            Solid concentration: 25% w/v (200 ml L. paracasei NFBC 336 in 1500 ml RSM), CFU/g 10<sup>10</sup>            Solvent: Water, Reconstituted skim milk            Carrier, Filmogen: 25% w/v reconstituted skim milk (RSM)</p> <p><b>Spray Drying Process Parameters</b>            Inlet temperature: 100°C            Outlet temperature: 71 - 78°C            Pump rate: -            Gas spray flow: -            Drying gas flow: -            Nozzle diameter: -</p> <p><b>Results</b>            Particle size: -            Morphology: -            Yield: -            Encapsulation efficiency: -</p> <p><b>Additional Information</b>            Journal Paper, Year: Appl. Environ. Microbiol., Vol. 67, No. 1, p. 420-425 (2006)            Title: Direct In Situ Viability Assessment of Bacteria in Probiotic Dairy Products Using Viability Staining in Conjunction with Confocal Scanning Laser Microscopy            Remarks: Spray drying yielded skim milk powders containing viable lactobacilli at 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> CFU/g            Corresponding author: M.A.E. Auly, G.E. Gardiner, S.J. McBrearty, E.O. O'Sullivan, D.M. Mulvihill, J.K. Collins, G.F. Fitzgerald, C. Stanton and R.P. Ross, mauly@moorepark.teagasc.ie            University/Institution: Teagasc, Dairy Products Research Centre, Moorepark, Fermoy and Department of Food Science and Technology and Department of Microbiology, University College Cork            Country: Ireland</p>
<p><b>BÜCHI Mini Spray Dryer B-290</b> <b>Application Note</b></p> <p><b>Lactobacillus paracasei (3)</b></p> <p><b>General Information</b>            Product category: Food, Microorganism, Bacteria, Food supplement            Type of application: Spray drying            Industrial sector: R&amp;D, Food            Applied device: BÜCHI Mini Spray Dryer B-191            Recommended device: BÜCHI Mini Spray Dryer <b>B-290</b></p> <p><b>Sample Preparation</b>            Solid concentration: 400 ml actively growing cultures, heat adapted at 52°C for 15 min.            Solvent: Water, Reconstituted skim milk            Carrier, Filmogen: reconstituted skim milk (RSM)</p> <p><b>Spray Drying Process Parameters</b>            Inlet temperature: 170°C            Outlet temperature: 85 - 105°C            Pump rate: -            Gas spray flow: -            Drying gas flow: -            Nozzle diameter: -</p> <p><b>Results</b>            Particle size: -            Morphology: -            Yield: -            Encapsulation efficiency: -</p> <p><b>Additional Information</b>            Journal Paper, Year: Int. Dairy J., Vol. 11, No. 10, p. 801-806 (2001)            Title: Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying            Remarks: Viability of the heat-adapted L. paracasei NFBC336 in RSM was enhanced 10-fold during spray drying.            Corresponding author: C. Desmond, C. Stanton, G. F. Fitzgerald, K. Collins and R. P. Ross, cpross@moorepark.teagasc.ie            University/Institution: Dairy Products Research Centre, Teagasc, Moorepark, Fermoy and Department of Microbiology, University College, Cork            Country: Ireland</p>	<p><b>BÜCHI Mini Spray Dryer B-290</b> <b>Application Note</b></p> <p><b>Probiotic milk</b></p> <p><b>General Information</b>            Product category: Food, Microorganism, Bacteria, Food supplement            Type of application: Spray drying            Industrial sector: R&amp;D, Food            Applied device: BÜCHI Mini Spray Dryer B-191            Recommended device: BÜCHI Mini Spray Dryer <b>B-290</b></p> <p><b>Sample Preparation</b>            Solid concentration: 20% w/v, CFU 2.25*10<sup>9</sup>/g            Solvent: Water, Reconstituted skim milk            Carrier, Filmogen: Lactobacillus rhamnosus GG in reconstituted skim milk 20% or 10% w/v, 10% w/v polydextrose</p> <p><b>Spray Drying Process Parameters</b>            Inlet temperature: 170°C            Outlet temperature: 85 - 90°C            Pump rate: -            Gas spray flow: -            Drying gas flow: -            Nozzle diameter: -</p> <p><b>Results</b>            Particle size: -            Morphology: -            Yield: -            Encapsulation efficiency: -</p> <p><b>Additional Information</b>            Journal Paper, Year: J. Appl. Microbiology, Vol. 96, p. 1024-1035 (2004)            Title: Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances            Remarks: Survival under drying stress was examined            Corresponding author: B.M. Corcoran, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald and C. Stanton, cstanton@moorepark.teagasc.ie            University/Institution: Teagasc, Dairy Products Research Centre, Moorepark, Fermoy, Co. Cork and Department of Microbiology, University College, Cork and Alimentary Pharmabiotic Centre, Cork            Country: Ireland</p>

Figura II.7. Procedimientos de secado sugeridos en las aplicaciones de Büchi

## PROPAGACION DE LA CEPA

Cultivo congelado Cepa X

↓  
1º ON (over night – 37°C – 16 h)

↓  
2º ON (over night – 37°C – 16 h)

↓  
Inocular 4ml del 2º ON (1%) en 400ml de caldo MRS

↓  
Incubar 20 h - 37°C

## CENTRIFUGACIÓN

Centrifugar 5000g (6000 rpm) -10 min- 4°C/5°C

↓  
Decantar y extraer con pipeta estéril el medio de cultivo sobrenadante

↓  
Lavar con buffer fosfato pH 7 - 0,1M, dos lavados. Centrifugar

**PELLET**

## RESUSPENSIÓN DEL PELLETT EN EL MEDIO DE SECADO

Resuspender dos pellets, cada uno en 200 ml de leche en polvo descremada reconstituida (LPD) al 20% estéril a temperatura ambiente, en erlenmeyer estéril

Dejar reposar 1 hora

↓  
Sacar muestra y contramuestra de 1ml y colocarlo en tubo eppendorf para realizar la siembra (Recuento Inicial)

↓

**SECADO SPRAY**

Pasar por el Mini spray agua estéril al menos 1 hora para esterilizar y poner en régimen el equipo. Esterilizar el vaso colector de polvo y mantenerlo en estufa a 40 – 50 °C, hasta el momento de usar. Pasar la suspensión de bacterias en el medio de secado.

***Condiciones de secado:***

Tº entrada: 170°C

Tº salida: 80 – 85°C

Flujo: 600 l h<sup>-1</sup>

Concentración de sólidos: LDP reconstituida al 20%, ó

LDP reconstituida al 10% + sol al 10% de almidón ó WPC 35.

↓

***PROBIÓTICOS EN POLVO***

↓

Reconstituir una muestra del polvo obtenido al 20% con agua de peptona estéril en tubos falcon estériles. Sembrar (Recuento Final)

↓

Para controles posteriores de cada polvo obtenido almacenar en bolsitas envasando al vacío.

**Figura II.8.** Diagrama de procedimiento aplicado para el secado de bacterias probióticas

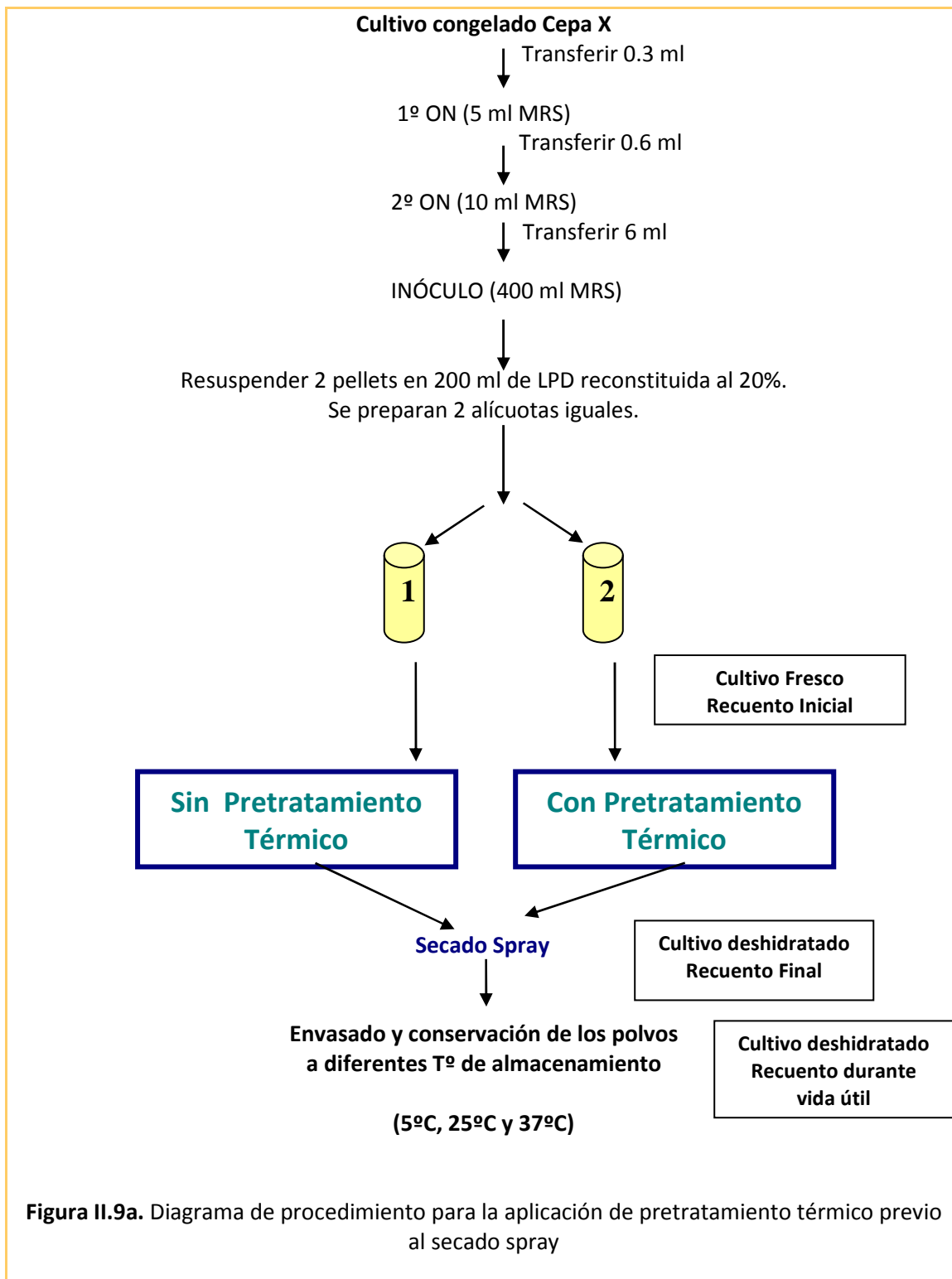


## II.4. Procedimientos ejecutados en los ensayos

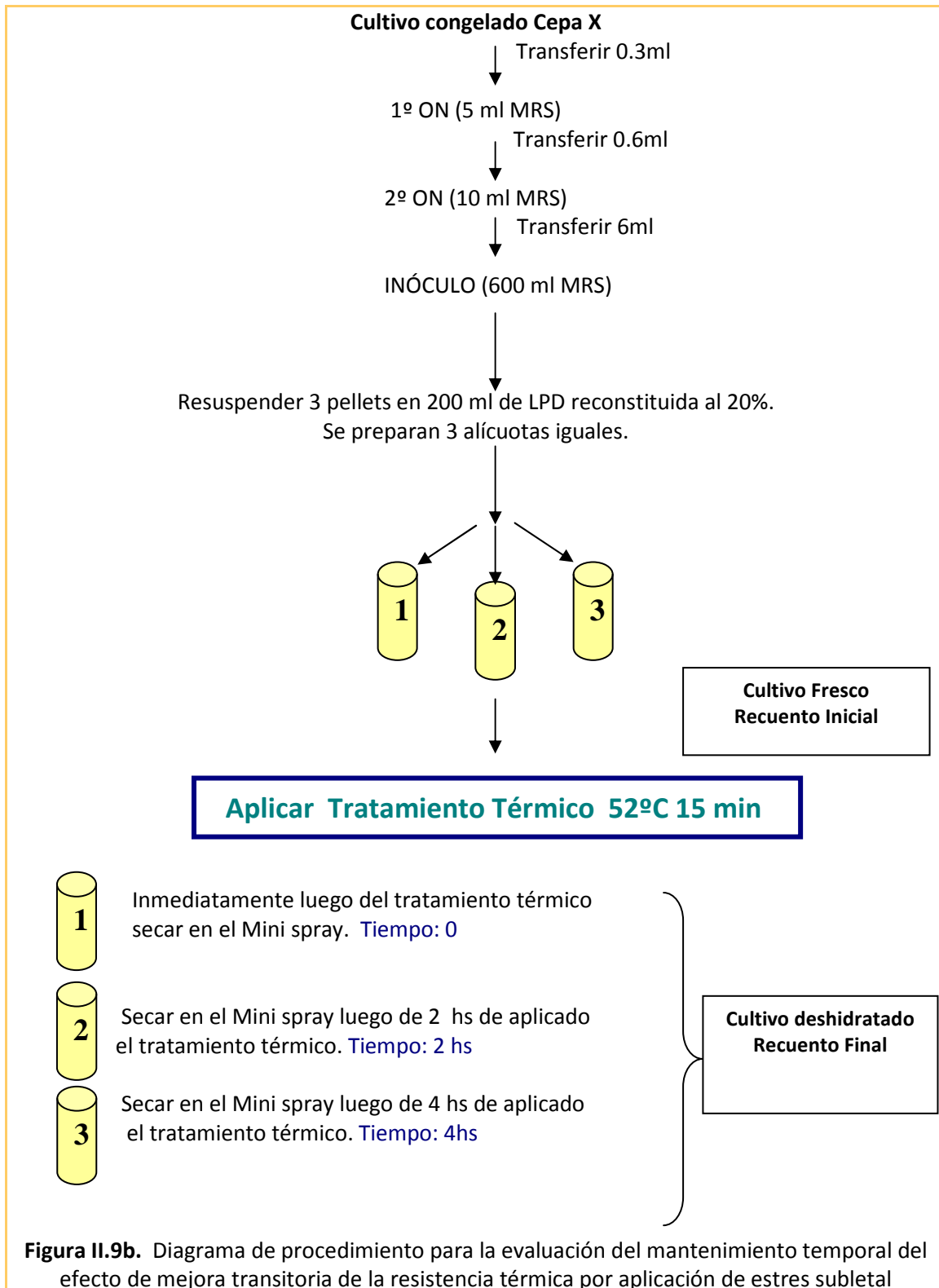
### II.4.1. Evaluación del efecto del tratamiento térmico subletal previo al secado spray

Las cepas *L. plantarum* INL, *L. paracasei* A13, *L. plantarum* 8329, *L. acidophilus* A9 y *L. casei* Dan fueron seleccionadas para aplicarles deshidratación por secado spray. Los cultivos overnight en caldo MRS fueron cosechados (6000xg, 15 min, 5°C), lavados dos veces con solución PBS (pH 7,1), resuspendidos en LPD reconstituida al 20% (p/v) y sometidos o no a un pretratamiento térmico moderado (PTT) (52°C por 15 min) de acuerdo a Desmond, et al. (2001). Las suspensiones celulares fueron deshidratadas. El recuento de lactobacilos se llevó a cabo antes y después del secado spray y periódicamente durante el almacenamiento a 5°, 25° y 37 ° C por 75 días. En la **Figura II.9a** se presenta el diagrama con el procedimiento aplicado.

También se realizaron pruebas para evaluar la estabilidad del efecto positivo del pretratamiento térmico previo al spray. Las suspensiones celulares en LPD reconstituida al 20% (obtenida como se describe arriba) fueron sometidas a calentamiento suave de 52° C por 15 min en agua caliente e inmediatamente enfriados en un baño de agua helada. Las suspensiones celulares fueron inmediatamente secadas por spray o mantenidas a 5°C por 2 y 4 horas antes del secado spray. Se realizaron los recuentos celulares, antes y después del secado spray. En la **Figura II.9b** se presenta el diagrama con el procedimiento aplicado.



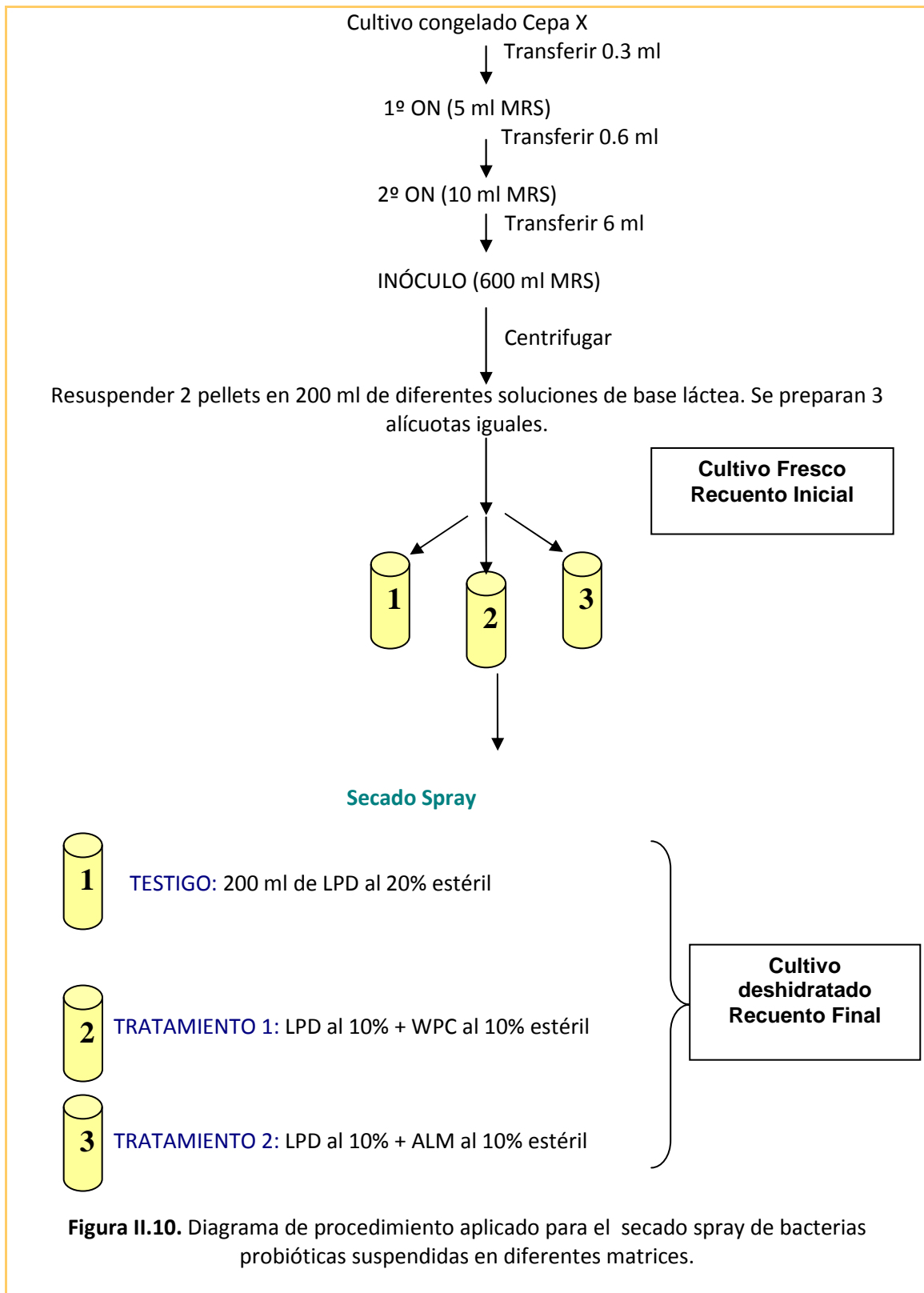
**Figura II.9a.** Diagrama de procedimiento para la aplicación de pretratamiento térmico previo al secado spray



#### II.4.2. Evaluación del efecto de diferentes matrices de secado

Este ensayo permitió evaluar la supervivencia de bacterias probióticas seleccionadas suspendidas en diferentes materiales soporte.

Se suspendieron cultivos overnight de *L.c. Dan*, *L.a. A9* and *L.p. A13* en LPD reconstituida al 20% (p/v), LPD reconstituida al 10% (p/v) + almidón al 10% (p/v) o LPD reconstituida al 10% (p/v) + WPC 35 al 10% y secaron por spray. El almidón y el WPC son ingredientes de bajo costo y/o alta funcionalidad. No se aplicó el pretratamiento térmico (PTT) antes del secado spray. Los recuentos de probióticos, antes y después del secado spray, se realizaron en agar MRS (48h, 37°C, incubación aeróbica). Se realizaron 2 secados por cada tratamiento para cada cepa. En la **Figura II.10.** se presenta el diagrama con el procedimiento aplicado.



### **II.4.3 – Ensayos de adición en alimentos**

#### **II.4.3.1. Adición de bacterias probióticas microencapsuladas a leche entera en polvo (LEP).**

El objetivo de esta prueba fue evaluar la sobrevivencia de los probióticos microencapsulados ya incorporados en la leche en polvo.

Se trabajó con la cepa *L.p. A13*. En el ensayo se utilizó el polvo obtenido a partir de la deshidratación de *L.p. A13* suspendido en LPD al 20% deshidratado, sin y con tratamiento térmico previo al spray, para realizar las mezclas con leche entera en polvo (LEP).

Se ensayaron mezclas de LEP con diferentes concentraciones: M1 con 2% y M10 con 10% del probiótico deshidratado adicionado en frasco estéril. Se agita manualmente el frasco al menos 20 veces. A partir de cada mezcla se separan 4 alícuotas de 10g. y se envasan en bolsas estériles para stomacher. Se toma muestra de cada mezcla (M1 y M10) a tiempo cero. Se envasan al vacío las alícuotas y se almacenan a 25 °C. Se evalúa la supervivencia mediante recuento de lactobacilos en cada una de las mezclas a cada tiempo (0, 30, 60, 90 y 120 días).

#### **II.4.3.2. Adición de bacterias probióticas microencapsuladas en diferentes alimentos líquidos y sólidos**

El objetivo de esta prueba fue evaluar la sobrevivencia de los probióticos microencapsulados ya incorporados en distintos alimentos sólidos y líquidos con diferentes pH. Se utilizaron polvos de las cepas *L.p. A13*, *L.a. A9* y *L.c. Dan* con una concentración promedio de  $5 \times 10^9$  UFC/g.

Los alimentos líquidos a los que se adicionó el concentrado probiótico deshidratado fueron: agua estéril, agua envasada de mesa, leche entera UHT, leche chocolatada, jugo cítrico envasado en tetrapack y bebida láctea adicionada con jugos de fruta.

Se agregó 1 g del probiótico deshidratado en 100 ml de la matriz, se homogeneizó agitando y se dejó 10 minutos en reposo antes de preparar las diluciones para la siembra. Se evaluó la supervivencia del probiótico inmediatamente después y luego de 30 y 60 minutos desde el momento de la adición. En todos los casos se evaluó el pH de la matriz. Se realizaron dos repeticiones por cada cepa por alimento.

En el ensayo de adición del concentrado de probióticos en alimentos sólidos se trabajó con las mismas cepas y los alimentos que se ensayaron fueron una fórmula infantil, gelatina, un alimento para bebés en base a cereales (Nestum) y un jugo cítrico deshidratado. El probiótico en polvo se adicionó al 10% (1 g PP + 10 g de alimento sólido). El alimento se preparó o se reconstituyó según las indicaciones del fabricante en el envase. Del alimento preparado se tomaron las muestras para los análisis. Se evaluó supervivencia del probiótico asumiendo el consumo del alimento inmediatamente después de su preparación. En todos los casos se evaluó el pH del alimento. Se realizaron dos repeticiones por cada cepa por alimento.

## **II.5. Caracterización de los probióticos deshidratados**

### **II.5.1. Características físico-químicas**

#### **II.5.1.1. Determinación de humedad residual**

Se realizó esta determinación según la técnica de referencia (FIL - IDF 26 A: 1993) y también aplicando balanza halógena.

El contenido de humedad de un polvo es la pérdida en peso expresada en por ciento después de 3 horas de secado a 102° C. Se calcula la pérdida de peso y la humedad se determina como porcentaje del peso del polvo.

$$\% \textit{Humedad} = \frac{P2 - P3}{P2 - P1} * 100$$

En la fórmula: P1: Peso pesafiltro vacío; P2: Peso pesafiltro con polvo; P3: Peso pesafiltro con polvo seco.

#### **II.5.1.2. Determinación de humectabilidad**

La humectabilidad de un polvo refleja su capacidad de absorber agua a una determinada temperatura. Es el tiempo en que el polvo desaparece bajo la superficie del agua, o bien cuando el agua penetra en la capa de polvo.

Para determinar la humectabilidad en los polvos, se agregan en un vaso de precipitado 10 g. ± 0.1 g. de polvo en 100 ml. de agua a 20° C +/- 2° C. El tiempo que se necesita para una humectación total del polvo se mide con un cronómetro. La humectabilidad es igual al tiempo, en segundos, que tarda la humectación. La reproducibilidad de la técnica es de ± 1,5 seg para una humectabilidad ≤ a 15 seg.



### **II.5.1.3. Determinación de $a_w$**

El contenido de agua libre influye tanto en el desarrollo bacteriano como en la reactividad química y enzimática de los alimentos. La actividad acuosa ( $a_w$ ) indica la cantidad de agua libre en una muestra, es decir la cantidad de agua no ligada química ni físicamente, es decir, el agua de la muestras disponible para ser usada por los microorganismos u otros agentes destructivos.

Esta determinación se realizó en el Instituto de Tecnología de los Alimentos (ITA – FIQ – UNL). Para la ejecución de la misma se utilizó un higrómetro Aqua lab (Mod. 3TE, Decagon Devices, Inc., EE. UU.). Este equipo sigue el principio de la técnica del punto de rocío, la cual consiste en colocar la muestra, distribuida completamente en la superficie de un recipiente, y esperar hasta que se equilibre con el espacio de cabeza dentro de una cámara cerrada que contiene un espejo, por medio del cual se detecta la condensación del agua contenida en la muestra en equilibrio con la humedad relativa del aire en la cámara (Decagon Devices, Inc., 2007). La calibración del dispositivo se realizó utilizando carbón activado ( $a_w < 0.5$ ) y agua destilada ( $a_w = 1.000 \pm 0.003$ ); posteriormente se introdujo 1 gramo de muestra a la cámara y se registró la lectura (Rodríguez, 2009).

### **II.5.2. Pruebas de viabilidad y estabilidad en cultivos frescos y deshidratados**

Para determinar la concentración de microorganismos viables en los cultivos probióticos frescos se llevaron a cabo diluciones seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) en agua de peptona (0,2 %) y se realizó un recuento de microorganismos viables en placa empleándose agar MRS para bacterias lácticas (BAL). El recuento de bacterias realizado

por duplicado se determina después de 48 hs de incubación a 37°C. Por cada muestra se enumeran dos diluciones y se informa el promedio de ambas.

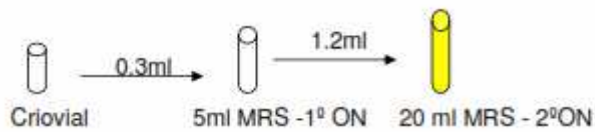
Para los cultivos probióticos deshidratados se realizó una dilución al 20% en agua de peptona previo a la siembra y posterior a esto se realizó la siembra de idéntica manera. Los resultados se expresaron como UFC/ml para los productos líquidos y en UFC/g para los polvos.

### **II.5.3. Estudio de resistencia a la digestión gástrica simulada**

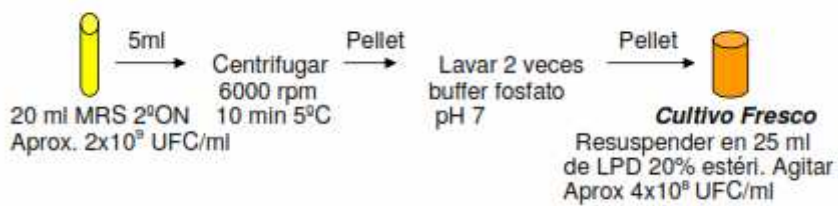
Para este estudio se mezclaron las suspensiones celulares (5 ml) en las diferentes matrices (LPD reconstituida al 20% (p/v), LPD reconstituida al 10% (p/v) + almidón al 10% (p/v) ó LPD reconstituida al 10% (p/v) + WPC 35 al 10%), antes o después del secado spray, con el mismo volumen de solución “saliva – gástrica” conteniendo CaCl<sub>2</sub> (0.22 g l<sup>-1</sup>), NaCl(16.2 g l<sup>-1</sup>), KCl (2.2 g l<sup>-1</sup>), NaHCO<sub>3</sub> (1.2 g l<sup>-1</sup>) and 0.3% (p/v) pepsina porcina y ajustando a pH 2.50 con HCl 5 M and 1 M (Vinderola et al., 2011).

Se tomaron muestras de un mililitro inmediatamente después de mezclar (antes se ajusto el pH) y después de 30, 60 y 90 min. de incubación a 37 °C en baño de agua para realizar el recuento de lactobacilos (MRS, 37 °C, incubación aeróbica, 48 h). Finalmente, se tomó una muestra después de 90 min. (Digestión gástrica simulada), se centrifugó (6000×g, 15 min., 5 °C) y resuspendió en caldo MRS conteniendo 0.5% (p/v) de sales biliares bovinas (Sigma) a pH 7.4. Las suspensiones celulares se incubaron a 37 °C por 60 min. (shock biliar) y se realizaron recuentos después de la incubación (MRS, 37 °C, incubación aeróbica, 48 h). Los ensayos se realizaron por triplicados independientes. En las **Figuras II.11. y II.12.** se detallan los diagramas del procedimiento de preparación de las muestras y de la digestión gástrica simulada.

- **Propagación de la cepa**



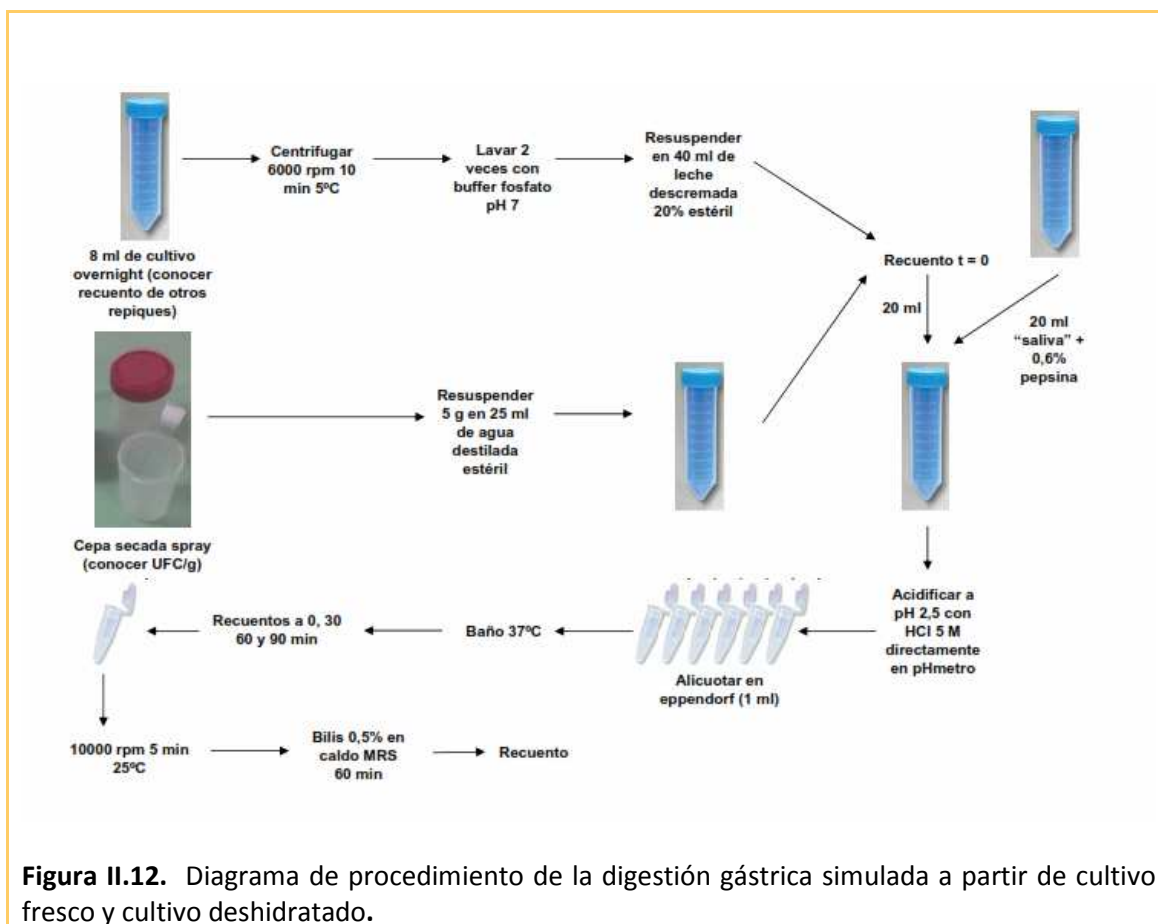
- **Preparación del inóculo a partir del 2º ON para la digestión:**



- **Preparación del polvo secado Spray de la cepa :**



**Figura II.11.** Preparación de las cepas para la digestión gástrica simulada



#### II.5.4. Estudios con microscopía electrónica

Los cultivos frescos y deshidratados se enviaron refrigerados al Servicio de microscopía Electrónica del Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO, UNT – CONICET, Tucumán, Argentina) para la realización de los estudios SEM y TEM. El tiempo entre la cosecha y fijación de las células y el posterior procesamiento de las muestras en el INSIBIO no excedió las 18 horas. Se fotografiaron los cultivos frescos y los polvos obtenidos (sin rehidratarse) por microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM). Se parte de cultivos ON frescos resuspendidos en solución PBS (pH 7,4) y fijados con glutaraldehído (de acuerdo a las instrucciones del laboratorio que ejecuta los estudios de SEM y TEM).

### II.5.5. Pruebas de funcionalidad con probióticos frescos y deshidratados

Las pruebas de funcionalidad *in vivo* se realizaron en el Bioterio del INLAIN – FIQ – UNL (**Figura II.13**). Se trabajó con ratones BALB-C obtenidos del bioterio de la FCV-UNL (Esperanza, Santa Fe). Los animales recibieron (intubación intragástrica)  $10^8$  UFC/día/animal de las cepas en estudio. Al término del período de alimentación los animales se anestesiaron y se sacrificaron por dislocación cervical, extrayéndose el intestino delgado para ser procesado para la obtención de cortes histológicos. El número de células productoras de IgA+ se determinó mediante inmunofluorescencia directa (Vinderola y col., 2005). Los resultados se expresaron como el número de células IgA+ cada 10 campos (aumento 400 x).



**Figura II.13.** Ensayos *in vivo* con ratones en el Bioterio del INLAIN - UNL

## II.6. Medios de cultivo y Soluciones

### II.6.1. Medios de cultivo utilizados

El Agua Peptonada Tamponada (APT), el medio De Man Rogosa & Sharpe (MRS) y el agar fueron provistos por Biokar Diagnostics (Beauvais, France). Se detalla la composición de estos medios de cultivo utilizados durante este estudio.

- **Caldo MRS (de Man, Rogosa and Sharpe, 1960) (Biokar Diagnostics, France)**

Peptona	10	g/L
Extracto de carne	10	g/L
Extracto de levadura	5	g/L
D(+) glucosa	20	g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	g/L
Tween	80	g/L
Citrato ácido de amonio	2	g/L
Acetato de sodio	5	g/L
MgSO <sub>4</sub>	0.1	g/L
MnSO <sub>4</sub>	0.05	g/L
pH	6.5 ± 0.2	

- **Agar MRS**

Caldo MRS adicionado con agar en concentración 1.2 g/100 ml.

- **Agua peptonada tamponada**

Peptona	10.0	g/L
Cloruro de sodio	5.0	g/L
Difosfato de sodio	3.5	g/L
Fosfato de potasio	1.5	g/L
pH	7.2 ± 0.2	

### **II.6.2. Preparación de medios de cultivo**

Todos los medios de cultivo, excepto los casos indicados, se esterilizaron en autoclave a 121 °C (1 atmósfera) durante 15 minutos.

- *CALDO MRS*

Se pesan 55,3 g y se disuelven en 1 litro de agua destilada. Repartir alícuotas de 5 ml. en tubos de ensayo. Tapar y esterilizar. Guardar en lugar fresco y seco.

- *AGAR MRS*

Se prepara caldo MRS según la indicación para distribuir en dos frascos Schott de 200 ml. Se agrega 1,2% de agar y se esteriliza. Guardar en lugar fresco y seco, hasta el momento de usar.

- *AGUA DE PEPTONA*

Se prepara con peptona de carne al 0,2% en agua destilada.

A todos los medios preparados se les realiza control de esterilidad. Se prepara el medio de cultivo. Esterilizar, atemperar, incubar en estufa a 37°C – 24 hs (ON). Si no crece nada se almacena hasta su uso.

### **II.6.3. Soluciones utilizadas**

Se empleó leche descremada comercial (La Serenísima S.A., Argentina) para la preparación de leche descremada estéril al 20% y al 10% p/v, Almidón (Glutal S.A., Argentina) al 10% p/v y WPC 35 (concentrado de proteínas de suero – ARLA Foods Ingredients S.A., Argentina) al 10% p/v. También se utilizaron las siguientes soluciones: buffer fosfato pH 7.2, HCL 1M y 5M, Bilis al 0.5%, Solución saliva + 0.6% de pepsina e NaOH.

#### II.6.4. Preparación de soluciones

- **Leche Descremada en Polvo.** Se utilizó una solución de dilución al 20% y esterilizar. Ni bien baja la presión, sacar los frascos y ponerlos a enfriar en agua. La leche se esteriliza a 90°C por 30 minutos.
- **WPC 35 (Concentrado de proteínas de suero – Arla Foods Ingredientes – Verónica SA).** Se utilizó una solución de dilución al 10% con agua estéril.
- **Almidón (Glutal SA):** Se utilizó una solución de dilución al 10% con agua estéril.
- **Solución Saliva:** para un volumen de 200ml se agregan: 0,22 gr/l Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), 16,2 gr/l Cloruro de Sodio ( $\text{ClNa}$ ), 2,2 gr/l Cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ ), 1.2 gr/l Nitrato ácido de Sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )
- **Solución Saliva + pepsina al 0.6%:** de la solución Saliva preparada se toman 45ml y se agregan 0.27 g de pepsina bovina.
- **Preparación de HCl 5M y 1M:** se parte de una solución HCl 10M 36.5% P/V. Se toman 100 ml de la solución de HCl 10M, se enrasa a 1000ml, obteniendo así una solución de 1M. Para la solución 5M, se toman 500 ml de la solución HCl 10M y se enrasa a 1000ml.
- **Solución Stock de bilis:** preparar 10ml de bilis al 10% (1gr de bilis + 10 ml de agua). Esterilizar en autoclave. A 5ml de MRS agregar 0.25 ml de solución Stock de bilis.

#### II.7. Equipamiento y material general de laboratorio.

- **Analizador Halógeno de humedad**

Para la determinación de humedad se utilizó el analizador halógeno de humedad HB43-S de Mettler Toledo (**Figura II.14**)



El analizador halógeno de humedad sirve para determinar el contenido de humedad de diferentes alimentos. El equipo trabaja según el principio termo gravimétrico.

El equipo consta básicamente de dos unidades: una balanza de precisión y una unidad de calentamiento. A diferencia de otros métodos termo gravimétricos (estufa de desecación, infrarrojo, microondas), el analizador halógeno de humedad opera con una unidad de calentamiento halógena. Ésta calienta rápidamente la muestra y garantiza así la pronta disponibilidad de los resultados. Al inicio de la medición el analizador de humedad determina el peso de la muestra, a continuación la muestra se calienta rápidamente con la unidad de calentamiento halógena integrada y la humedad se evapora. Durante la desecación el equipo calcula continuamente el peso de la muestra y visualiza la pérdida de humedad. Una vez concluida la desecación se visualiza, como resultado final, el contenido de humedad o el de la materia seca de su muestra. La rapidez del calentamiento, definida por el equipo para cada tipo de alimento, tiene importancia decisiva en la práctica.

El calentamiento uniforme del material de muestra garantiza la repetibilidad del resultado de secado y permite el trabajo con muestras de pesos reducidos. Gracias a ello se incrementa la velocidad de la determinación del contenido de humedad y mejora la productividad del análisis. Este equipo se calibra periódicamente contra un método de referencia.



**Figura II.14.** Analizador halógeno de humedad HB43-S Mettler Toledo

**Tabla II.3.** Características técnicas de los componentes de la balanza halógena

#### **Desecador**

Unidad de calentamiento: Radiador halógeno circular

Intervalo de temperatura: 50–200 °C

Paso de temperatura: 1 °C

Ajuste de la unidad de calentamiento: con kit de ajuste de temperatura HA-TC ó HA-TCC

#### **Balanza**

Peso mínimo de la muestra: 0.5 g

Peso máximo de la muestra: 54 g

Ajuste de la balanza: con pesa externa, 20 g  $\pm$  0.1 mg

Detector de estabilidad: con símbolo en el indicador

Precisión de indicación de balanza: 1 mg

Precisión de indicación de resultado: 0.01%

Repetibilidad (sd ) con 2 g de muestra: 0.10%

Repetibilidad (sd ) con 10 g de muestra: 0.015%

- **Equipamiento general de laboratorio**

En las figuras II.15, II.16, II.17 y II.18 se muestra parte del equipamiento general de laboratorio utilizado durante la ejecución de los ensayos de esta tesis.



**Figura II.15. Flujo laminar** Marca Casiba, modelo: modelo HL-1. – Lab. Calidad de leche INTA EEA Rafaela



**Figura II.16. Ultrafreezer -85°C** marca Nuairex – Lab de Sanidad Animal. INTA EEA Rafaela



**Figura II.17.** Centrifuga refrigerada de mesa. Marca: Thermo, modelo: Multi RF. Lab. Calidad de leche INTA EEA Rafaela



**Figura II.18.** pHmetro automático . Marca: Schott Instruments, modelo: Titroline Alpha Plus TAOS. Lab. Calidad de leche INTA EEA Rafaela

También se utilizaron los siguientes equipos:

Microscopio marca: Nikon Eclipse E 200

Autoclave. Marca: Aristóbulo Gómez Rupérez SA, modelo: VZ 100E40 Tipo Chamberland

Baños térmicos. Marca: Vikings, modelo: Masson; Marca: Bioelec (con agitación).

Modelo RC11

Balanzas. Marca: Mettler Toledo, modelo: AL 204 y PL602 S.

Homogeneizador. Marca: Vortex Boeco Germany, modelo: V-1

- **Materiales generales de laboratorio**

Se utilizaron tubos falcon estériles, viales estériles, tubos eppendorf, tips azules y amarillos, pHmetro calibrado entre los puntos y cajas de petri estériles.

## *Capítulo III.*

*Deshidratación de bacterias probióticas por secado spray. Influencia del pretratamiento térmico y del almacenamiento a diferentes temperaturas sobre la viabilidad celular.*

---

### **III.1. Objetivos**

Los objetivos de este capítulo fueron seleccionar entre cepas de lactobacilos posibles candidatos capaces de sobrevivir al secado spray y estudiar los efectos del tratamiento preliminar con calor y diferentes matrices alimentarias como soporte de microencapsulación en la supervivencia posterior al secado spray y durante la conservación.

### **III.2. Materiales y métodos**

#### **III.2.1 Cepas y condiciones de cultivo**

En este estudio se utilizaron un total de 22 cepas comerciales o de colección de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum* (Tabla III.1). El nombre de algunas de las cepas comerciales se cambió a fin de evitar algún conflicto de intereses. Las cepas de colección pertenecen a las colecciones del INLAIN (UNL – CONICET, Santa Fe, Argentina) y al CIDCA (UNLP – CONICET, La Plata, Buenos Aires, Argentina). Los cultivos overnight de células (16 h, 37°C) fueron obtenidos en caldo MRS después de tres transferencias a partir del stock congelado (-70°C) mantenido en MRS adicionado con 18% (p/v) de glicerol (Cicarelli, Santa Fe, Argentina).

#### **III.2.2 Ensayo de tolerancia térmica**

Se evaluó la resistencia térmica usando las condiciones sugeridas por Simpson, et al., (2005) en cultivos de células overnight cosechadas (6000xg, 15 min, 5°C), lavadas dos veces con solución buffer PBS (pH 7,1) y resuspendidas en caldo MRS o leche descremada en polvo reconstituida al 10% (SanCor, Santa Fe, Argentina). Las

suspensiones celulares fueron colocadas en baño de agua caliente a 60°C por 5 minutos e inmediatamente después enfriadas en baño de agua helada. Se realizaron recuentos celulares (Agar MRS, 48 h, 37°C, incubación aeróbica) inmediatamente antes y después de la exposición al calor.

### **III.2.3 Secado spray en leche descremada**

Las cepas *L. plantarum* INL, *L. paracasei* A13, *L. plantarum* 8329, *L. acidophilus* A9 y *L. casei* Dan fueron seleccionadas para secado spray. Los cultivos overnight en caldo MRS fueron cosechados (6000xg, 15 min, 5°C), lavados dos veces con solución PBS (pH 7,1), resuspendidos en LPD reconstituida al 20% (p/v) y sometidos o no a un pretratamiento térmico moderado (PTT) (52°C por 15 min) de acuerdo a Desmond et al., (2001). Las suspensiones celulares fueron deshidratadas en un secadero spray escala laboratorio (Büchi spray dryer model B290, Flawil, Switzerland) utilizando una temperatura de aire de entrada constante de 170°C, temperatura de salida de 85°C y un flujo de 600 litros/hora. Las condiciones del secado spray fueron previamente sugeridas como adecuadas para leche descremada (Gardiner et al., 2000; Gardiner et al., 2002; Ananta et al., 2005;). Las suspensiones celulares fueron atomizadas y deshidratadas en una cámara de secado que utiliza toberas de dos fluidos. Los polvos fueron envasados al vacío en sobres individuales con 10 g de muestra. Se determinó humedad residual (% p/p) por triplicado a 101±1 ° C (FIL-IDF 26 A: 1993). El recuento de lactobacilos se llevó a cabo antes y después del secado spray en agar MRS (37 °C, 48 h incubación aeróbica) y periódicamente durante el almacenamiento a 5°, 25° y 37 ° C por 75 días.



El tiempo de reducción decimal (valor  $D = 1/k$ , tiempo requerido para reducir la población microbiana un ciclo log) de cada cepa se determinó a partir de una regresión lineal entre el log del N° de bacterias al tiempo (t) e inicial ( $t_0$ ) ( $\log(N/N_0)$ ) y el período de almacenamiento (días) para cada temperatura de almacenamiento (5°, 25° y 37°C). Cada regresión lineal se ajustó a la siguiente ecuación:

$$\log \frac{N_t}{N_0} = -k.t \quad (\text{Ec. III.1})$$

La constante de inactivación  $k$  se determinó a partir de la pendiente de la regresión de ( $\log(N/N_0)$  vs tiempo a cada T° de almacenamiento.  $D_5$ ,  $D_{25}$  y  $D_{37}$  representan el tiempo en días requerido para reducir un ciclo log la viabilidad de las cepas a cada una de estas temperaturas, respectivamente.

Se realizaron tres o más réplicas de secados independientes por cada cepa.

#### **III.2.4 Estabilidad de la resistencia mejorada al secado spray obtenido por el tratamiento térmico**

Se utilizaron las cepas *L. casei* Dan, y *L. plantarum* 8329, a las que se les aplicó el pretratamiento térmico (PTT) suave (52 ° C, 15 min). Las suspensiones celulares en LPD reconstituida al 20% (obtenida como se describe arriba) fueron sometidas a calentamiento suave de 52° C por 15 min en baño de agua caliente e inmediatamente enfriados en un baño de agua helada. Las suspensiones celulares tratadas térmicamente fueron inmediatamente secadas por spray o mantenidas a 5°C por 2 y 4 horas antes del secado spray. Los recuentos celulares, antes y después del secado spray, se realizaron en agar MRS (48 h, 37 °C, incubación aeróbica).

### **III.2.5 Secado spray en diferentes matrices de secado**

Se suspendieron cultivos overnight de *L.c.Dan*, *L.a.A9* and *L.p.A13* en LPD reconstituida al 20% (p/v), LPD reconstituida al 10% (p/v) + almidón al 10% (p/v) (Glutal S.A., Buenos Aires, Argentina) o LPD reconstituida al 10% (p/v) + WPC 35 al 10% (whey protein concentrate, concentrado de proteínas de suero Arla Foods Ingredients S.A., Argentina) y se secaron por spray (como se describió previamente). El almidón y el WPC son ingredientes de bajo costo y/o alta funcionalidad. El uso de almidón como carrier fue sugerida por O'Riordan et al. (2001). No se aplicó el pretratamiento térmico (PTT) antes del secado spray. Los recuentos de probióticos, antes y después del secado spray, se realizaron en agar MRS (48h, 37°C, incubación aeróbica).

### **III.2.6 Análisis estadísticos**

Los resultados de recuentos celulares se transformaron a unidades log 10 y se expresaron como medias  $\pm$  desviación standard ó diferencia log de al menos tres experiencias independientes en cada ensayo.

En el ensayo de tolerancia térmica se aplicó un análisis de conglomerados como método descriptivo para seleccionar cepas para futuros ensayos. Para las cepas seleccionadas se aplicó un análisis de variancia no paramétrico (Test de Kruskal Wallis), a fin de poder detectar diferencias en los recuentos celulares entre cepas después que se aplicó el pretratamiento térmico (PTT). En el ensayo de secado spray se aplicó un análisis de variancia no paramétrico para evaluar el efecto de la aplicación o no del PTT sobre la sobrevivencia posterior al secado spray y, un análisis factorial (pretratamiento térmico, temperatura y tiempo) con medidas repetidas en el tiempo para el estudio de conservación de los polvos. En el ensayo con diferentes matrices se

realizó un análisis de variancia con un arreglo factorial de las variables de análisis (matrices y cepas). El análisis multivariado y las comparaciones (ANOVA) se realizaron usando el programa estadístico Software InfoStat (Grupo InfoStat, Facultad Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).

### III.3. Resultados

#### III.3.1. Tolerancia térmica

Con el fin de identificar cepas de lactobacilos sensibles y tolerantes al estrés por calor, suspensiones de células en caldo MRS o en 10% (p/p) de leche descremada fueron expuestas a tratamiento térmico de 60°C por 5 min. En la **Tabla III.1** puede observarse la pérdida en la viabilidad celular. La muerte celular varió de 1,91 a 6,20 orden log en caldo MRS y de 0,95 a 4,1 orden log en leche descremada. El deterioro más pronunciado en la viabilidad celular se observó en cepas *L. acidophilus*.

Se llevó a cabo un análisis de conglomerados para evaluar agrupamientos de cepas basados en los niveles de  $\Delta$  log UFC/ml antes y después del tratamiento térmico, en los dos medios evaluados (MRS y leche descremada), buscando formar grupos homogéneos que se diferenciaron unos de otros. Se utilizó un agrupamiento jerárquico con una media euclidiana como medida de distancia (**Figura III.1**).

En análisis de clusters o conglomerados es una técnica de análisis exploratorio de datos para resolver problemas de clasificación. Las técnicas de clasificación basadas en agrupamientos implican la distribución de las unidades de estudio en clases o categorías de manera tal que cada clase (conglomerado) reúne unidades cuya similitud es máxima bajo algún criterio. Es decir los objetos en un mismo grupo comparten el mayor número permisible de características y los objetos en diferentes grupos tienden

a ser distintos. Permite descubrir asociaciones y estructuras en los datos. El dendrograma es una representación gráfica en forma de árbol para observar cómo se formaron los grupos. La decisión sobre el número óptimo de clusters es subjetiva. Existen diversas formas de medir la distancia entre clusters que producen diferentes agrupaciones y diferentes dendogramas. Para agrupar objetos (casos o variables) es necesario seguir algún algoritmo. Los algoritmos o métodos de agrupamiento permiten identificar clases existentes en relación a un conjunto dado de atributos o características. Los algoritmos de clasificación pueden dividirse en no jerárquicos y jerárquicos. En las técnicas de clasificación jerárquicas, se pretenden encontrar particiones jerarquizadas, esto es, consecutivamente más finas (o menos finas), luego los objetos son unidos (o separados) en grupos paso por paso.

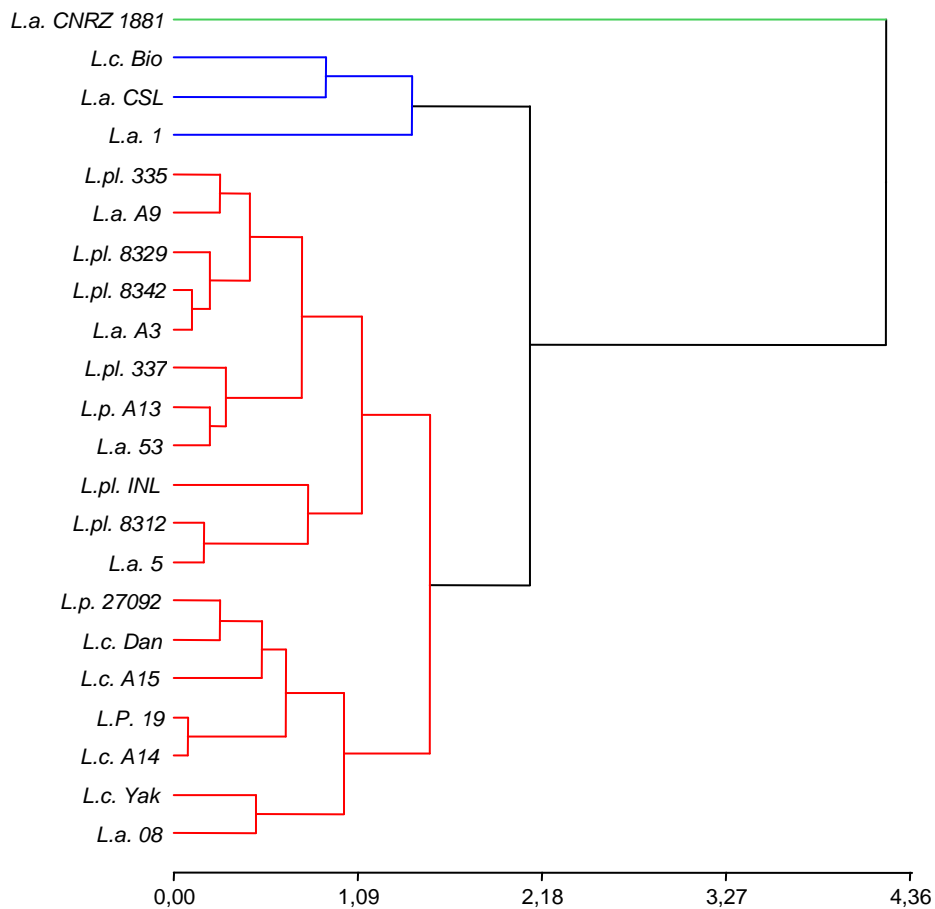
El agrupamiento logrado dependerá no sólo del algoritmo de agrupamiento elegido sino también de la medida de distancia seleccionada, del número de grupos que deben ser formado (cuando esta información existe), de la selección de las variables para el análisis y del escalamiento de las mismas. En este caso particular se utilizó la media, en el cual la distancia entre clusters se calcula como la distancia media entre pares de observaciones, una de cada cluster.

Los resultados muestran que *L.a.* CNRZ 1881 estaba separada del resto de las cepas ya que presentaba la mayor pérdida en la viabilidad celular. Un segundo grupo estaba compuesto por cepas con comportamiento errático o resistencia mínima al calor en uno de los dos medios evaluados (L.c. Bio, L.a. CSL and L.a.1). El tercer grupo estaba formado por las cepas restantes que no presentaron diferencias significativas a la tolerancia al calor. Tomando en cuenta la falta de diferencias significativas en la resistencia al calor entre *L. casei* Dan y *L. paracasei* A13, así como su importancia en la

industria alimenticia argentina y el potencial probiótico de algunos cultivos de cepas de *L. plantarum*, se seleccionaron las cepas *L. casei* Dan, *L. paracasei* A13, *L. plantarum* INL y 8329 y *L. acidophilus* A9 para el estudio del efecto del tratamiento calórico subletal en la supervivencia al secado spray y al almacenamiento a distintas temperaturas.

**Tabla III.1.** Resistencia térmica (muerte celular en ciclos log) de cepas de *Lactobacillus* después de la exposición a 60°C por 5 min en caldo MRS ó en LPD reconstituida al 10% (p/v).

Especie	Cepa	Orígen	Resistencia Térmica ( $\Delta$ log UFC ml <sup>-1</sup> antes y después del tratamiento térmico)	
			Caldo MRS	Leche Descremada
<b>L. casei and paracasei</b>	<i>L.c</i> Dan	Producto Comercial	2.47 ± 0.36	1.38 ± 0.39
	<i>L.p.</i> 27092	Producto Comercial	2.44 ± 1.14	1.61 ± 0.33
	<i>L.p.</i> 19	Producto Comercial	3.26 ± 0.70	1.57 ± 0.81
	<i>L.c.</i> A15	Producto Comercial	2.90 ± 0.13	1.18 ± 0.39
	<i>L.c.</i> A14	Producto Comercial	3.35 ± 1.07	1.53 ± 0.69
	<i>L.c.</i> Bio	Producto Comercial	4.15 ± 0.14	2.13 ± 0.04
	<i>L.c.</i> Yak	Producto Comercial	1.91 ± 0.98	1.34 ± 0.09
	<i>L.p.</i> A13	Producto Comercial	2.42 ± 0.37	2.20 ± 0.29
<i>L. acidophilus</i>	<i>L.a.</i> 1	Producto Comercial	6.03 ± 0.67	1.49 ± 0.75
	<i>L.a.</i> 5	Producto Comercial	3.78 ± 0.15	3.00 ± 0.05
	<i>L.a.</i> CSL	Producto Comercial	5.22 ± 1.17	2.24 ± 0.46
	<i>L.a.</i> A3	Producto Comercial	3.24 ± 0.70	2.47 ± 0.44
	<i>L.a.</i> A9	Producto Comercial	2.91 ± 0.59	2.27 ± 1.07
	<i>L.a.</i> 08	Producto Comercial	1.69 ± 0.48	0.95 ± 0.08
	<i>L.a.</i> 53	Producto Comercial	2.28 ± 0.86	2.35 ± 0.70
	<i>L.a.</i> CNRZ 1881	Colección CNRZ	6.20 ± 0.31	4.91 ± 1.78
<i>L. plantarum</i>	<i>L.pl.</i> INL	Producto Comercial	2.91 ± 0.20	3.05 ± 0.21
	<i>L.pl.</i> 8312	Colección CIDCA	3.96 ± 0.96	3.09 ± 0.13
	<i>L.pl.</i> 8329	Colección CIDCA	3.02 ± 0.29	2.64 ± 1.48
	<i>L.pl.</i> 8342	Colección INLAIN	3.19 ± 1.03	2.56 ± 1.03
	<i>L.pl.</i> 335	Colección Oregon	3.18 ± 0.48	2.13 ± 0.94
	<i>L.pl.</i> 337	Colección Oregon	2.15 ± 0.30	2.07 ± 0.32



**Figura III.1.** Dendrograma de la distancia euclídea entre cepas de lactobacilos realizado por el método de encadenamiento promedio y representación de los tres grupos creados.

### III.3.2. Pretratamiento térmico y secado spray

Se eligieron condiciones más moderadas de pre-tratamiento térmico (52°C por 15 min) comparadas con los valores de los experimentos de selección (60°C por 15 min). Estas condiciones de calor más moderadas no afectaron la viabilidad celular antes del secado spray en ninguno de los casos (datos no mostrados). El valor medio de humedad de los polvos obtenidos luego del secado spray fue de 3,69%± 0,62 (p/p), variando de 2,02% a 4,89% (p/p). La **Tabla III.2** muestra el conteo de células de los cultivos antes y después del secado spray, con y sin aplicación previa de tratamiento

calórico moderado. No se observaron diferencias significativas debido al secado spray en *L.p.* A13, *L.a.* A9 o en *L.pl.* INL, con o sin aplicación de pretratamiento térmico moderado. En *L.c.* Dan y *L.pl.* 8329 el pretratamiento térmico moderado fue efectivo para reducir la muerte celular asociada con el secado spray de 0,85 a 0,16 orden log y de 0,95 a 0,49 orden log, respectivamente (**Tabla III.2**). Los resultados se presentan como % de supervivencia en la **Fig. III.2**.

**Tabla III.2.** Supervivencia de lactobacilos al secado spray (SS) en leche descremada en polvo reconstituida al 20% con pretratamiento térmico (CPTT) o sin pretratamiento térmico (SPTT) (52°C - 15 min).

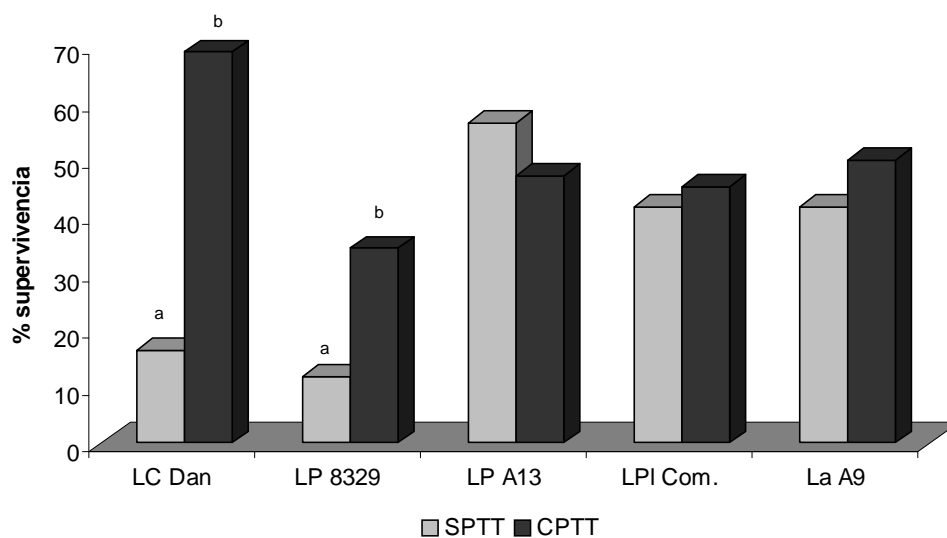
Cepa	Tratamiento térmico	Recuento Celular (log CFU ml <sup>-1</sup> )		Muerte celular (Δ log antes y después SS)
		Antes SS	Después SS*	
<i>L.c.</i> Dan	CPTT	8.63 ± 0.23 <sup>a</sup>	8.46 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.03 <sup>c</sup>
	SPTT	8.73 ± 0.22 <sup>a</sup>	7.88 ± 0.52 <sup>b</sup>	0.85 ± 0.30 <sup>d</sup>
<i>L.pl.</i> 8329	CPTT	8.93 ± 0.30 <sup>a</sup>	8.44 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.18 <sup>c</sup>
	SPTT	9.01 ± 0.10 <sup>a</sup>	8.06 ± 0.24 <sup>b</sup>	0.95 ± 0.14 <sup>d</sup>
<i>L.p.</i> A13	CPTT	8.90 ± 0.11 <sup>a</sup>	8.43 ± 0.50 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.23 <sup>c</sup>
	SPTT	8.97 ± 0.03 <sup>a</sup>	8.68 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.21 <sup>c</sup>
<i>L.pl.</i> INL	CPTT	8.91 ± 0.24 <sup>a</sup>	8.55 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.17 <sup>c</sup>
	SPTT	9.12 ± 0.31 <sup>a</sup>	8.68 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.35 <sup>c</sup>
<i>L.a.</i> A9	CPTT	9.06 ± 0.07 <sup>a</sup>	8.76 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.05 <sup>c</sup>
	SPTT	9.02 ± 0.00 <sup>a</sup>	8.62 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.16 <sup>c</sup>

<sup>a,b</sup> Recuento celular en filas con diferentes letras son significativamente diferentes (p < 0.05)

<sup>c,d</sup> Δ log en columnas para la misma cepa con letras distintas son significativamente diferentes (p < 0.1)

\* Los polvos fueron reconstituidos al volumen de líquido original para la enumeración de células viables después del secado spray (SS).

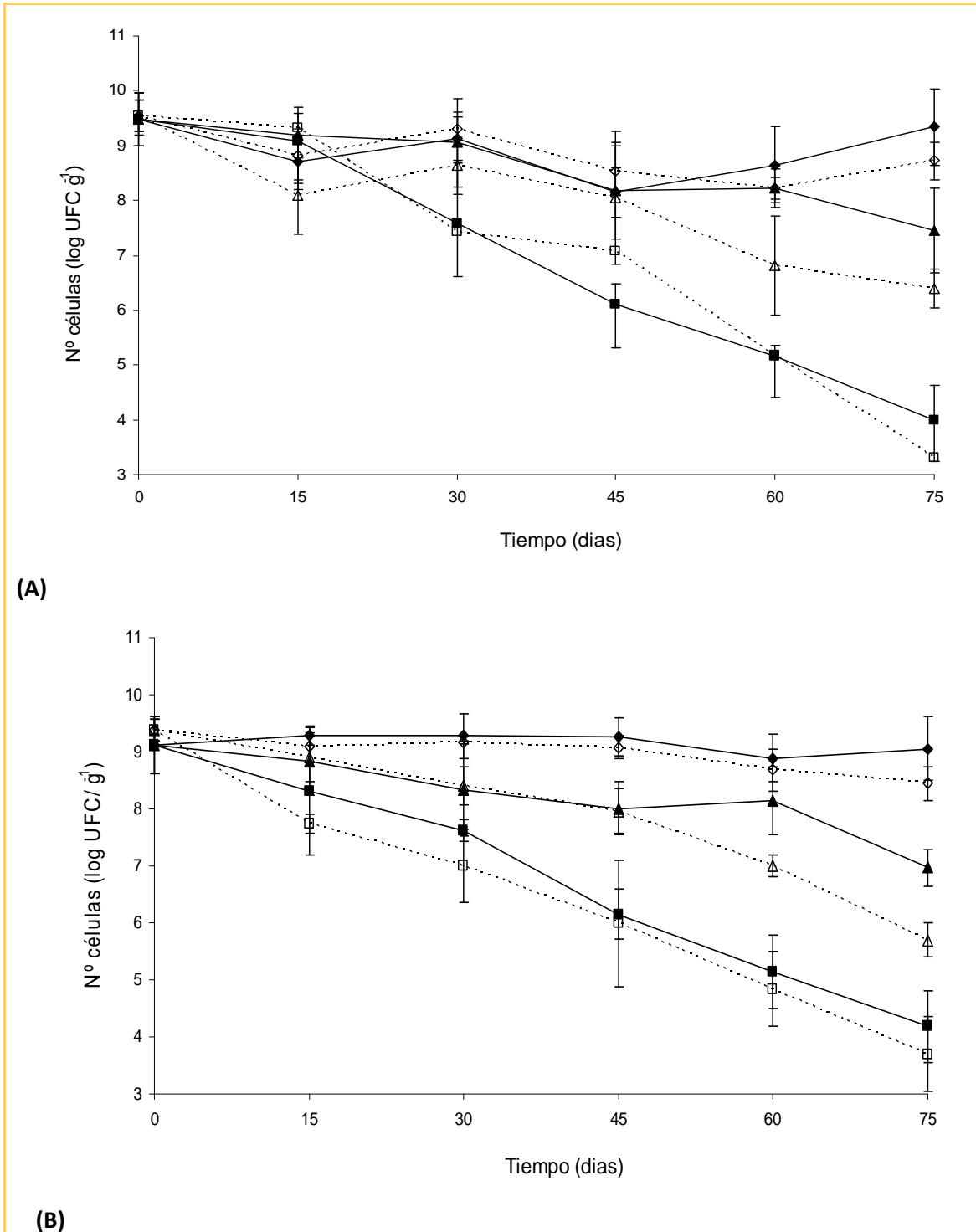


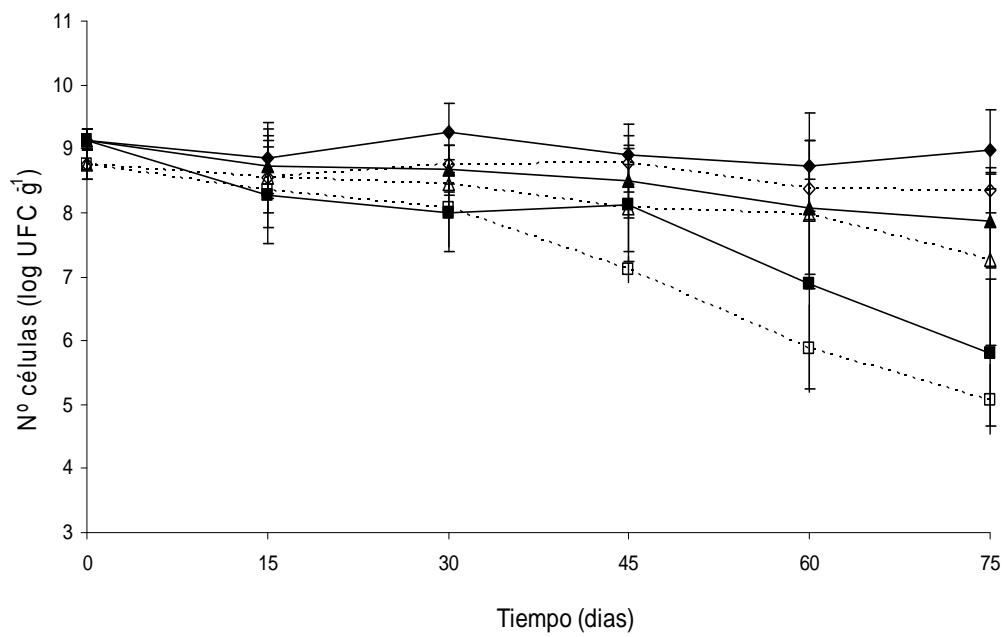


**Figura III.2.** Porcentaje de supervivencia al secado spray con (CPTT) o sin pre-tratamiento térmico (SPTT). <sup>a,b</sup>: letras diferentes en las barras para una misma cepa son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

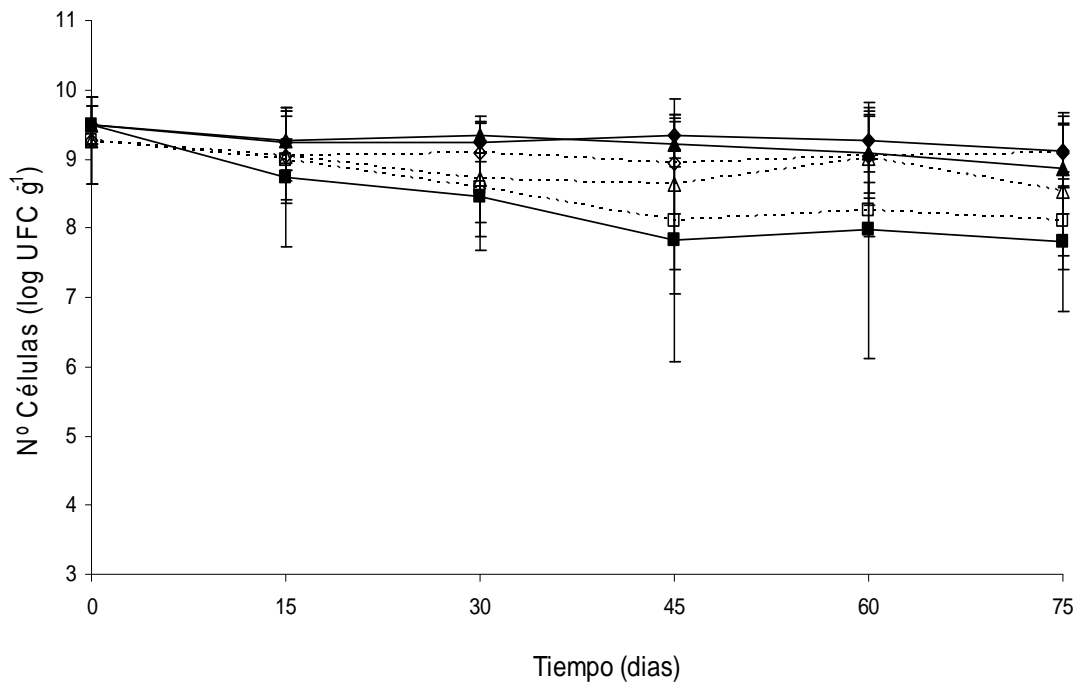
La supervivencia de Lactobacilos en los polvos obtenidos y sellados al vacío fue estudiada durante 75 días de almacenamiento a 5°C, 25°C y 37°C (**Figura III.3**). En general se observó una disminución gradual en el conteo de células a medida que la temperatura de almacenamiento aumentaba, principalmente en *L. plantarum* INL (**Figura III.3a**) y en *L. paracasei* A13 (**Figura III.3b**). Al terminar el período de almacenamiento, el mayor conteo celular se observó en los polvos mantenidos a 5°C, en todas las cepas. El pretratamiento térmico moderado reforzó significativamente ( $p < 0.05$ ) la supervivencia de *L. plantarum* 8329 durante el almacenamiento en las tres temperaturas evaluadas (**Figura III.3c**). Para las otras cepas no hubo diferencias significativas de supervivencia en el almacenamiento cuando se compararon cultivos tratados y no tratados con calor. No se observó deterioro significativo en la viabilidad de las células en *L.c.* Dan a 5°C o 25°C durante el almacenamiento (**Fig III.3e**), pero a

37°C a no se obtuvieron recuentos celulares a los 30 días. En *L.c. Dan* y *L.pl. 8329* se observó una pérdida considerable de viabilidad celular luego del tratamiento por pulverización cuando no existió aplicación previa de pretratamiento térmico moderado (Tabla III.2).

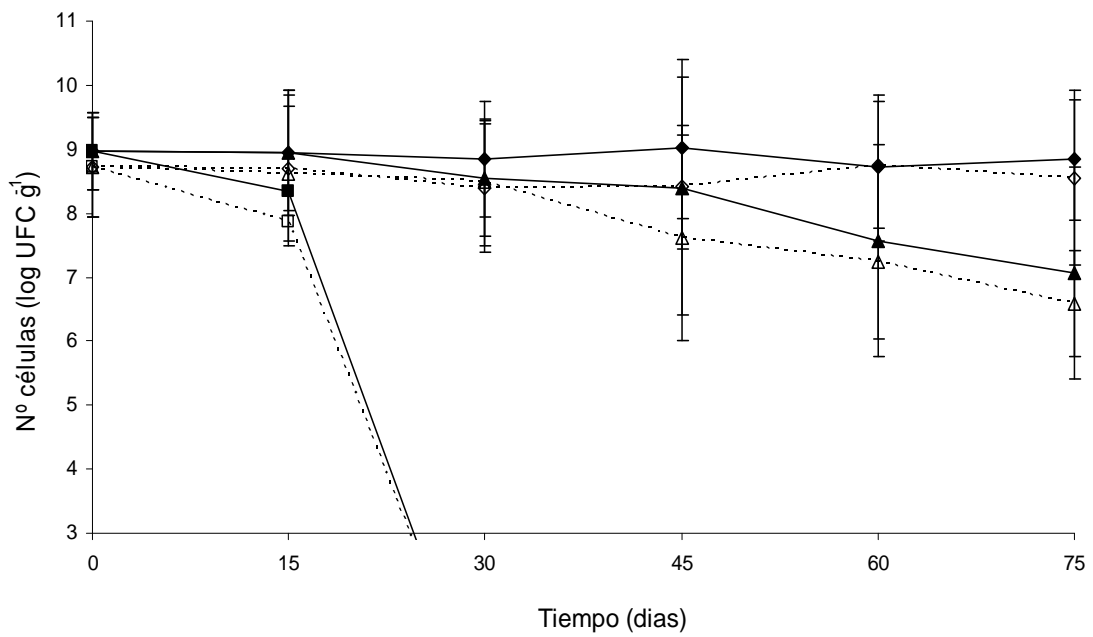




(c)



(D)



(E)

**Figura III.3.** Supervivencia *L.pl.* INL (A), *L.p.* A13 (B), *L.pl.* 8329 (C), *L.a.* A9 (D) and *L.c.* Dan (E) secadas spray, obtenidas con (CPTT - línea sólida) ó sin (SPTT - línea entrecortada) pretratamiento térmico, durante el almacenamiento a 5°C (◆), 25°C (▲) o 37°C (■).

También se determinó si una demora entre el pretratamiento térmico y el secado spray podría representar la pérdida de la capacidad aumentada a la supervivencia al secado spray en leche descremada. La **Tabla III.3** muestra el conteo celular en polvos reconstituidos secados por pulverización cuando las suspensiones de células fueron secadas por pulverización luego de 2 a 4 horas de la aplicación de pretratamiento térmico. No se observaron diferencias importantes en ninguno de los casos, mostrando que la resistencia aumentada al secado spray obtenida tras el pretratamiento térmico se mantenía, al menos, por 4h luego de la aplicación.

**Tabla III.3.** Recuento celular de *L. casei* Dan y *L. plantarum* 8329 antes o después del secado spray (SS). El secado spray fue llevado a cabo después de 0, 2 ó 4 h de aplicación del pretratamiento térmico (52°C- 15 min)

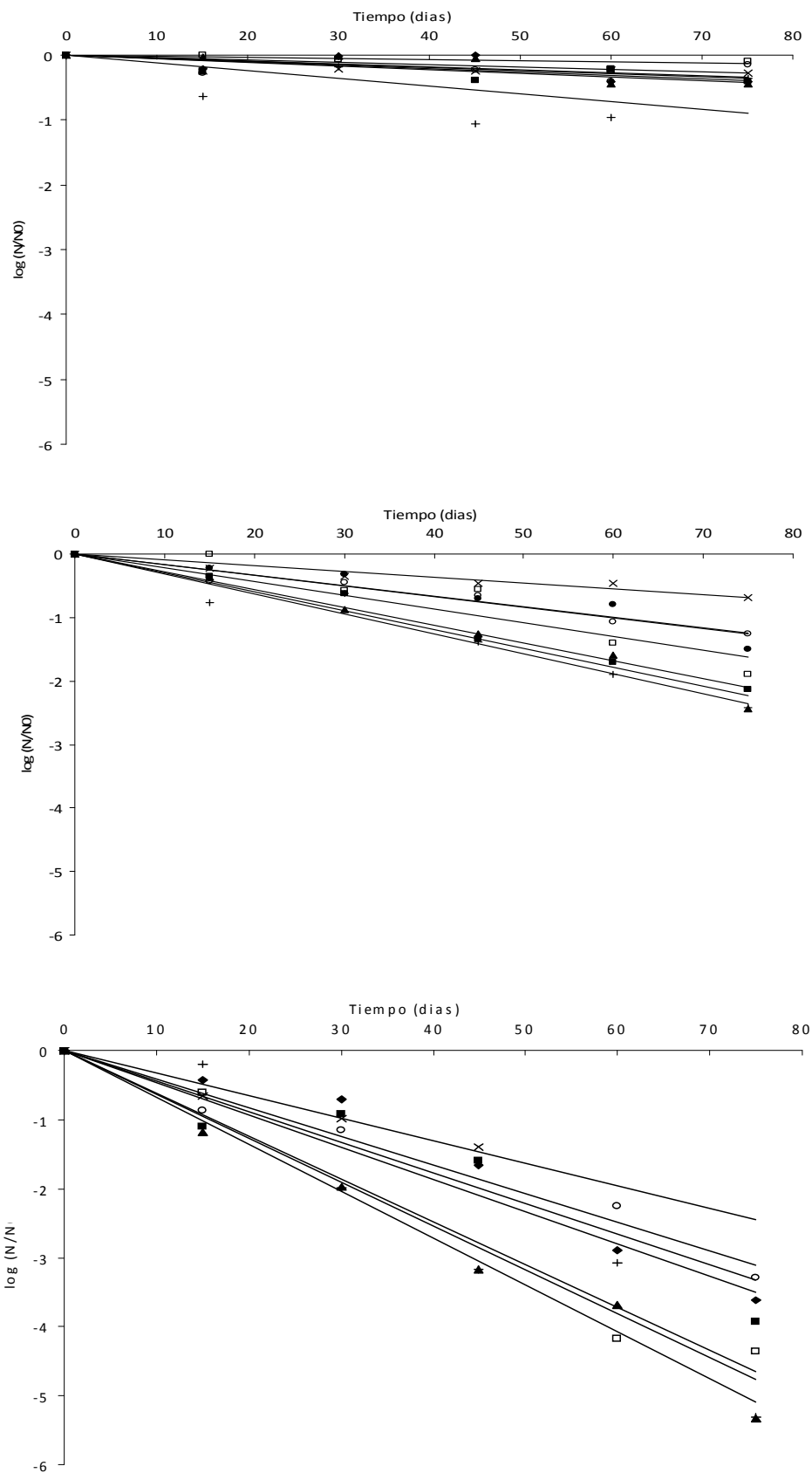
Cepa	Recuento Celular (log UFC ml <sup>-1</sup> )			
	Antes secado spray	Después secado spray*		
		Después del pretratamiento térmico (h)		
		0 h	2 h	4 h
<i>L.c. Dan</i>	9.23 ± 0.06 <sup>a</sup>	9.04 ± 0.08 <sup>a</sup>	9.04 ± 0.11 <sup>a</sup>	8.82 ± 0.16 <sup>a</sup>
<i>L.pl. 8329</i>	9.33 ± 0.16 <sup>a</sup>	9.10 ± 0.15 <sup>a</sup>	8.97 ± 0.26 <sup>a</sup>	8.95 ± 0.13 <sup>a</sup>

\* Los polvos producidos fueron reconstituidos al volumen de líquido original para la enumeración de células viables después del secado spray.

La estabilidad de las células deshidratadas durante el almacenamiento puede evaluarse a partir de la tasa de inactivación (**k**) ó del valor (**D**) tiempo de reducción decimal (valor  $D = 1/k$  - tiempo requerido para reducir la población microbiana un ciclo log). Cualquiera de estos valores facilita la comparación de la estabilidad de las células con valores en diferentes condiciones. Los mismos se calculan de acuerdo a un

modelo cinético de primer orden, tal como lo presentaron diversos autores (Ananta et al., 2005; Chavez et al., 2007; Golowkszyc et al., 2010, Foerst et al., 2012, Soukoulis et al., 2013; Solmaz et al., 2013). Se aplicó un análisis diferenciado según la aplicación o no del tratamiento térmico previo al spray (CPTT o SPTT), sólo a aquellas cepas que manifestaron diferencias significativas en la supervivencia post deshidratación (*L.c. Dan* y *L.pl. 8329*).

En la **Figura III.4** se presentan la regresión aplicada a los datos obtenidos a diferentes temperaturas de almacenamiento. Las regresiones a 25º y 37º C ajustaron bien ( $R^2= 0,80 - 0,98$ ). Los valores de *k* fluctuaron dependiendo de la cepa y con el incremento de la Tº de almacenamiento para la misma cepa. En la **Tabla III.4** se presentan los tiempos de reducción decimal obtenidos para cada cepa deshidratada en función de las temperaturas de almacenamiento. El comportamiento durante la conservación fue diferente según la temperatura de almacenamiento y la cepa. Según los valores D, la cepa con mayor capacidad de conservación a 5ºC fue *L.c. Dan CPTT*, seguida por *L.pl. 8329* y *L.a. A9*. Sin embargo, la cepa *La A9* fue la de mayor estabilidad durante la conservación a 25º y 37ºC. Este resultado coincide con el de Solmaz et al., (2013) quien menciona que cepas de *L. acidophilus* conservadas a Tº ambiente tienen menores tasa de inactivación que otras cepas probióticas tales como *L. rhamnosus* y *L. plantarum*.



**Figura III.4.** Pérdida de viabilidad expresada a través de la tasa de inactivación ( $k$ ) de cada cepa: *L.pl.* INL (+), *L.p.* A13 (▲), *L.a.* A9 (x), *L.pl.* 8329 (◆ CPTT y ◇ SPTT) y *L.c.* Dan (■ CPTT y □ SPTT), durante el almacenamiento a 5°C (A), 25°C (B) y 37°C (C).

**Tabla III.4.** Tiempo de reducción decimal D (días) de diferentes cepas deshidratadas utilizando LPD como carrier durante el almacenamiento a 5º, 25º y 37º C.

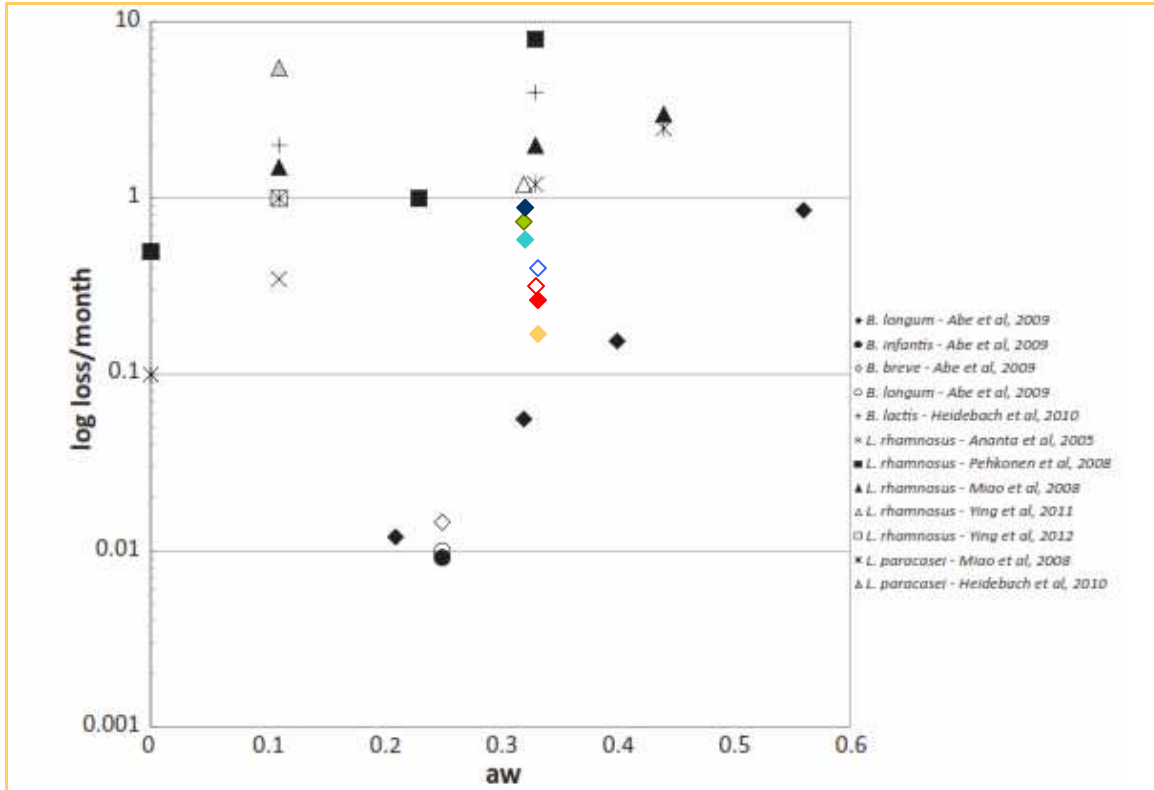
<b>Cepa</b>	<b>D (días)</b>		
	<b>5º C</b>	<b>25º C</b>	<b>37º C</b>
<b><i>L.pl.</i> INL</b>	83	32	16
<b><i>L.p.</i> A13</b>	200	34	15
<b><i>L.a.</i> A9</b>	250	111	38
<b><i>L.pl.</i> 8329 SPTT</b>	200	63	23
<b><i>L.pl.</i> 8329 CPTT</b>	250	59	24
<b><i>L.c.</i> Dan SPTT</b>	143	36	21
<b><i>L.c.</i> Dan CPTT</b>	400	45	16

La **Fig. III. 5** adaptada de Makinen et al (2012) presenta la tasa de inactivación de varios probióticos (expresado como pérdida de unidades log por mes) almacenados a 25 ° C en función de la  $a_w$  (recopilación de datos de diferentes publicaciones y datos de las cepas estudiadas en esta tesis). Se observa la idoneidad de varias cepas de probióticos deshidratados con posibilidad de utilizarse en diferentes tipos de matrices alimentarias, teniendo en cuenta el posible rango de  $a_w$  en alimentos deshidratados (cereales, galletas, snacks, alimento balanceado, leche en polvo, fórmulas infantiles y suplementos dietarios oscilan entre 0,1 a 0,5).

Según Makinen et al. (2012) la pérdida de 1 unidad log durante un año de vida de anaquel es económicamente aceptable. Como se observa en el gráfico la mayoría de las cepas probióticas muestran este nivel de pérdida de viabilidad en un mes. También es interesante observar, que las bifidobacterias, que se consideran generalmente más



sensibles al oxígeno que los lactobacilos, fueron el género bacteriano más estable durante el almacenamiento.



**Figura III.5.** Visión conjunta de las tasas de inactivación de bacterias probióticas a 25°C basada en datos de la literatura. Se incluyen las tasas de inactivación de las cepas evaluadas en esta tesis a 25°C. (Adaptado de Makinen et al., 2012)

- ◆ *L. pl.* INL
- ◆ *L.p.* A13
- ◆ *L.c.* Dan SPTT
- ◆ *L. pl.* 8329 CPTT
- ◆ *L.a.* A9
- ◇ *L.c.* Dan CPTT
- ◆ *L. pl.* 8329 SPTT

### III.3.3. Secado en diferentes matrices de secado

La composición del medio de secado se puede modificar para tratar de reducir el estrés térmico y osmótico que recibe la célula durante el secado.

En este trabajo, una cepa de cada especie/grupo fue seleccionada para el secado spray en diferentes matrices de alimentos con el objetivo de estudiar la influencia de la matriz alimentaria (leche descremada, almidón o WPC) o del tratamiento tecnológico (secado spray versus cultivo fresco) sobre la viabilidad. Se utilizó como protector leche descremada sola o con la adición de una cantidad similar de almidón o WPC.

La actividad acuosa es un parámetro crítico que afecta la procesabilidad, las propiedades de manejo y la estabilidad de los polvos lácteos (Ross, 2005). La humedad de los productos deshidratados obtenidos está relacionada con las condiciones de proceso (temperatura de entrada al spray y velocidad de alimentación) y con la composición del carrier (Barbosa Cánovas et al., 2005). También influye de manera significativa el tipo de proteína láctea incluida en el carrier (Soukoulis et al, 2013). El contenido de humedad de los polvos y el  $a_w$  debería ser igual o inferior al 4% y 0,3 respectivamente, para garantizar la estabilidad microbiológica de los polvos (Simpson et al., 2005; Fritzen Freire et al., 2012). En la **Tabla III.5** se observan los valores de humedad residual,  $a_w$  y humectabilidad obtenidos en las pruebas con diferentes carriers. Las microcápsulas de leche descremada más almidón fueron las de mayor humedad y  $a_w$  y las de menor tiempo de disolución en agua.

En relación a los resultados de viabilidad no se observaron diferencias en la reducción log por efecto del secado spray en ninguna de las matrices adicionadas a la LPD para las cepas estudiadas (**Tabla III.6**). Sin embargo, existe una tendencia a mínimos valores

en la reducción log por efecto del spray al utilizar almidón en el medio de suspensión. Esto se demuestra por una menor reducción log y por una menor variabilidad al utilizar esta matriz protectora. (**Fig. III.6**). Dado que no existieron diferencias significativas en la viabilidad, se evaluó si existen diferencias en la funcionalidad aplicando pruebas de resistencia gástrica (Resultados presentados en el Capítulo IV).

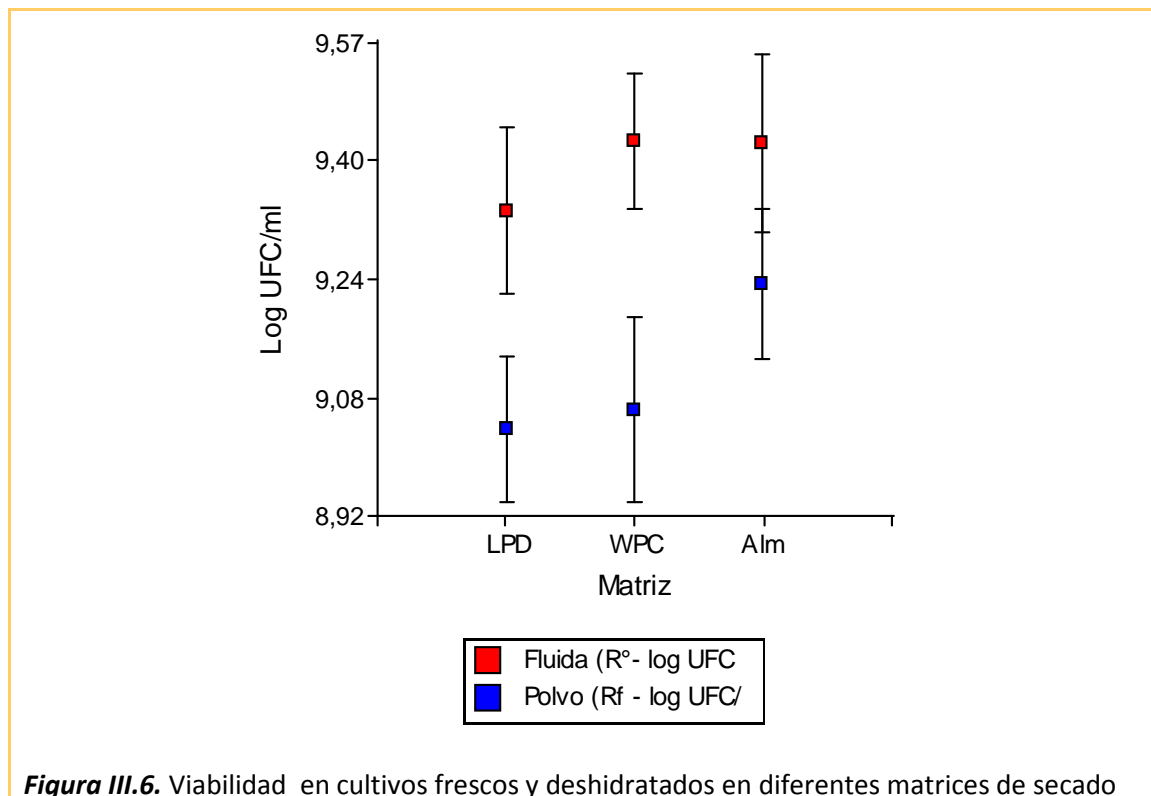
**Tabla III.5.** Efecto de las diferentes matrices de secado sobre propiedades tecnológicas de lactobacilos deshidratados.

Medio de secado	Humedad (%)	$a_w$	Disolución en agua (s)
LPD	3,68 ± 0,62	0,32 ± 0,033	263 ± 20,8
LPD + WPC 35	3,36 ± 0,71	0,35 ± 0,031	267 ± 27,2
LPD + Almidón	4,20 ± 0,73	0,39 ± 0,078	186 ± 20,6

**Tabla III.6.** Supervivencia de lactobacilos al secado spray (SS) en diferentes matrices lácteas.

Cepa	Matriz	Recuento celular (log UFC ml <sup>-1</sup> )	
		Antes SS	Después SS*
<i>L. casei</i> Dan	LD	9.01 ± 0.18 <sup>a</sup>	8.69 ± 0.07 <sup>a</sup>
	LD + almidón	9.18 ± 0.25 <sup>a</sup>	8.95 ± 0.24 <sup>a</sup>
	LD + WPC	9.18 ± 0.14 <sup>a</sup>	8.70 ± 0.13 <sup>a</sup>
<i>L. acidophilus</i> A9	LD	9.72 ± 0.28 <sup>a</sup>	9.32 ± 0.16 <sup>a</sup>
	LD + almidón	9.68 ± 0.48 <sup>a</sup>	9.45 ± 0.31 <sup>a</sup>
	LD + WPC	9.68 ± 0.26 <sup>a</sup>	9.31 ± 0.32 <sup>a</sup>
<i>L. paracasei</i> A13	LD	9.27 ± 0.22 <sup>a</sup>	9.12 ± 0.30 <sup>a</sup>
	LD + almidón	9.34 ± 0.20 <sup>a</sup>	9.24 ± 0.27 <sup>a</sup>
	LD + WPC	9.44 ± 0.32 <sup>a</sup>	9.22 ± 0.53 <sup>a</sup>

\*Los polvos producidos fueron reconstituidos al volumen de líquido original para la enumeración de células viables después del secado spray.



#### III.4. Discusión de los resultados

El secado spray, como tecnología para producir cultivos de probióticos, tiene como ventaja la rapidez y el costo relativamente bajo, comparado con la liofilización. La técnica es altamente reproducible y uno de los aspectos más importantes es que está disponible para la aplicación industrial. Sin embargo, los mayores problemas al aplicar esta tecnología son el uso de alta temperatura que no es siempre compatible con la supervivencia de todas las cepas bacterianas y la dificultad de rehidratación del producto (Burgain, et al., 2011; Silva et al., 2011). El secado spray ha sido usado para la fabricación de medios basados en leche en polvo descremada con alto contenido de bacterias viables de diferentes especies (Gardiner et al., 2000; Desmond et al, 2001; O'Riordan et al., 2001; Lian et al., 2002; Corcoran et al., 2004; Simpson et al., 2005),

sin embargo, el éxito de su aplicación parece ser, a diferencia de la liofilización, altamente dependiente de la cepa y de las condiciones ambientales. En este estudio, se llevó a cabo un control de la resistencia al calor en cepas comerciales y de colección de lactobacilos. Se seleccionaron cinco cepas para la aplicación (o no) de un pretratamiento térmico moderado y secado spray. Se estudió la viabilidad celular durante el almacenamiento a tres temperaturas diferentes. La duración de la resistencia aumentada en el secado spray fue también estudiada, al igual que la supervivencia al secado spray, en diferentes matrices de secado.

La resistencia intrínseca al calor es un factor importante para el secado spray que determinará la supervivencia a este proceso tecnológico. Estudios previos mostraron que cepas de la misma especie o especies relacionadas exhiben diferente resistencia al calor (Christiansen, et al., 2006) y por lo tanto diferente capacidad de supervivencia al secado spray (Lian et al., 2002; Golowczyc, et al., 2011;). Gardiner et al. (2000) mostraron que temperaturas por debajo de 55°C no producen diferencias significativas en la resistencia de las células al calor. Entonces, en este estudio se eligió una temperatura más alta (60°C) para evaluar la resistencia de las células al calor. Entre las cepas estudiadas, esta resistencia fue levemente más alta en *L. casei* y *L. paracasei* comparadas con *L. plantarum* y *L. acidophilus*. La mayoría de las cepas de *L. casei* y *L. paracasei* se encuentran en la parte inferior del dendrograma. Asimismo, la resistencia al calor fue más alta cuando las células estaban suspendidas en leche descremada comparado con el caldo MRS debido a la capacidad protectora de la leche al calor (Corcoran et al., 2004). Cuando las cepas *L.a.* CNRZ 1881, *L.a.* Bio, *L.a.* CSI y *L.a.* 1 fueron excluidas del análisis, no se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la resistencia al calor entre el resto de las cepas.

Cinco cepas de lactobacilos (*L. casei* Dan, *L. paracasei* A13, *L. plantarum* INL, *L. plantarum* 8329 y *L. acidophilus* A9) de las tres especies/grupos estudiados fueron seleccionadas en base a su importancia en el uso presente o potencial en la industria alimenticia argentina, ya que solamente la tolerancia al calor no es un indicador preciso de su futuro comportamiento durante el secado spray (Santivarangkna et al., 2008). Estas cepas fueron sometidas (o no) a adaptación previa con calor moderado (52°C, 15 min), como fue sugerido por Desmond et al., 2001 y luego al secado spray en leche descremada en polvo reconstituida al 20% (p/p). Sólo en *L. casei* Dan y *L. plantarum* 8329, la adaptación previa al calor demostró ser efectiva para aumentar la resistencia al secado spray, tal como fue informado por Desmond et al. (2002b) para *L. paracasei* NFBC 338. Condiciones adversas o estrés durante el crecimiento bacteriano pueden llevar a respuestas de tolerancia aumentadas. La adaptación térmica es un fenómeno claramente establecido descrito para lactobacilos (Gardiner et al., 2000) y ha servido como explicación de por qué las bacterias NSLAB puede superar la pasteurización y estar presente durante la maduración de algunos quesos.

La temperatura es un parámetro crítico que afecta la supervivencia de los microorganismos durante el almacenamiento (Texeira et al, 1995 a y b; Desmond et al, 2001). La supervivencia durante el almacenamiento a 5, 25 y 37°C fue inversamente proporcional a la temperatura de mantenimiento, como fue previamente descrito en lactobacilos (Gardiner et al., 2000; Golowckzyc et al. 2010). El efecto de adaptación al calor sobre una mayor capacidad de supervivencia durante el almacenamiento fue observado únicamente en *Lpl.* 8329. En este caso, el conteo de células fue más alto en todas las temperaturas de almacenamiento cuando los cultivos fueron primero sometidos a tratamiento con temperatura moderada, confirmando que algunos tipos

de estrés como el calor, pueden hacer que las bacterias ácido lácticas sean más tolerantes al secado spray (Peighambardoust et al., 2011).

La aplicación de un estrés subletal a temperatura moderada para aumentar la supervivencia durante el secado spray y el almacenamiento de polvos podría ser potencialmente usado a nivel industrial (Silva et al., 2011). En este caso, y debido a los mayores volúmenes de suspensiones de células procesadas en la industria, podría darse una demora entre el tratamiento de calor y el secado spray. En este sentido se tenía interés en establecer por cuánto tiempo una suspensión de células tratadas con calor podía ser mantenida a 5°C antes del secado spray, sin perder la resistencia aumentada al secado spray. Este tema fue estudiado en *L.c.* Dan y en *L.pl.* 8329, las cepas que mostraron una capacidad mejorada de supervivencia al secado por pulverización cuando se aplicó previamente pretratamiento térmico moderado (**Tabla III.2**). En ambos casos, la capacidad mejorada de supervivencia se mantuvo durante 4 hs después de la aplicación del tratamiento calórico. Esto puede ser explicado por la expresión permanente de proteínas citosólicas de estrés calórico (De Angelis et al., 2004).

Se ha demostrado que el carrier o medio utilizado durante el secado spray tiene marcada influencia sobre la supervivencia y la estabilidad durante el almacenamiento de los probióticos (Meng et al., 2008). Lian et al. (2002) concluyó que la viabilidad de las *Bifidobacterias* es altamente dependiente del tipo y concentración del carrier utilizado para el secado y varía con la cepa. La LPD al 20% (p/p) está considerada como el carrier con la concentración óptima de sólidos para asegurar una buena viabilidad en diferentes cepas de bacterias lácticas (Desmond et al, 2002; Lian et al., 2002; Corcoran et al., 2004; Carvalho et al., 2004; Ananta et al., 2005).

Para este trabajo de Tesis, tres cepas fueron seleccionadas para el secado en diferentes medios de suspensión con la intención de verificar el efecto de la matriz de secado, cuando no se aplicó pre-tratamiento térmico, en células resistentes al secado. Se probó la adición de proteínas (WPC 35) y carbohidratos (almidón de maíz) en idéntica proporción a la LPD. No se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular debido al secado spray en leche descremada o en leche descremada con el agregado de igual proporción de almidón o WPC. Sin embargo, existió una tendencia ( $p < 0,1$ ) que marca mejores tasas de supervivencia y mejor humectabilidad del polvo al utilizar LPD con almidón como matriz de secado.

### **III.5. Conclusiones del capítulo**

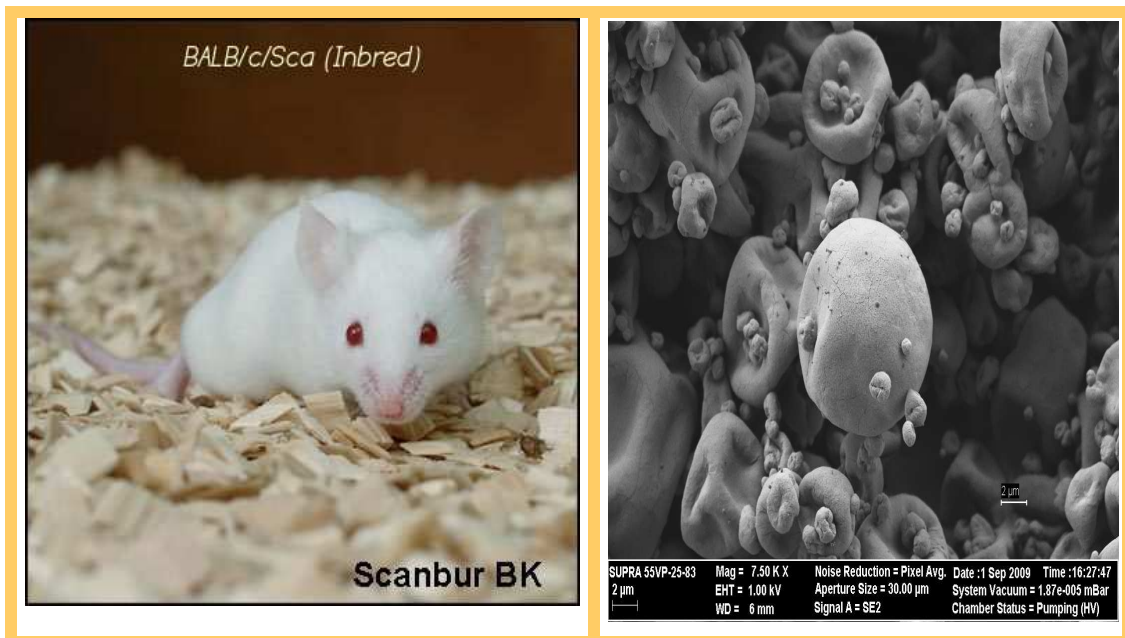
La supervivencia al secado spray y la estabilidad durante el almacenamiento son procesos complejos que resultan de la combinación de varios parámetros. En este capítulo se demostró que un tratamiento térmico no letal fue efectivo para aumentar la supervivencia de ciertas cepas de lactobacilos al secado spray y al almacenamiento de los polvos obtenidos. Esta capacidad de superar el estrés del secado se mantuvo por un mínimo de 4hs entre la aplicación del calor y el secado spray.

El secado spray se aplicó con diferentes resultados para las cepas evaluadas en cuanto a supervivencia y conservación. Se logró producir concentrados deshidratados de probióticos pero aún resta mejorar rendimientos, aspectos técnico - funcionales y vida útil de los polvos probióticos para ser adicionados en diferentes matrices alimenticias.



# Capítulo IV.

## *Efecto del secado spray sobre la funcionalidad de lactobacilos probióticos.*



## **IV.1. Objetivo**

El objetivo del presente capítulo fue la caracterización de la funcionalidad a través de ensayos *in vitro* e *in vivo* de tres cultivos probióticos sometidos a secado spray en leche descremada.

## **IV.2. Materiales y métodos**

### **IV.2.1 - Cepas y condiciones de cultivo**

Como se mencionó en el capítulo 3 se utilizaron las cepas *Lactobacillus acidophilus* A9, *Lactobacillus paracasei* A13 y *Lactobacillus casei* Dan. Los cultivos overnight de células (16 h, 37°C) fueron obtenidos en caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharp) (Biokar, Beauvais, Francia) después de tres transferencias a partir del stock congelado (-70°C) mantenido en MRS adicionado con 18% (p/v) de glicerol (Cicarelli, Santa Fe, Argentina).

### **IV.2.2 - Secado spray en leche descremada**

Las cepas *L. paracasei* A13, *L. acidophilus* A9 and *L. casei* Dan fueron seleccionadas para el secado spray. Los cultivos overnight en caldo MRS fueron cosechados (6000xg, 15 min, 5°C), lavados dos veces con solución PBS (pH 7,1), resuspendidos en LPD reconstituida al 20% (p/v). Las suspensiones celulares fueron deshidratadas en un secadero spray escala laboratorio (Büchi spray dryer model B290, Flawil, Switzerland) utilizando una temperatura de aire de entrada constante de 170°C, temperatura de salida de 85°C y un flujo de 600 litros/hora. Las condiciones del secado spray fueron previamente sugeridas como adecuadas para leche descremada (Gardiner et al., 2000; Gardiner et al., 2002; Ananta et al., 2005;). Las suspensiones celulares fueron

atomizadas y deshidratadas en una cámara de secado que utiliza toberas de dos fluidos. El producto es secado casi inmediatamente y el tiempo de residencia es muy bajo. Los polvos fueron envasados al vacío en sobres individuales con 10 g de muestra. En las muestras de polvo se determinó humedad residual (% p/p) por triplicado a  $101 \pm 1$  ° C (FIL-IDF 26 A: 1993) y actividad acuosa utilizando equipo Aqualab. El recuento de lactobacilos se llevó a cabo antes y después de cada secado spray en agar MRS (37 °C, 48 h incubación aeróbica).

#### **IV.2.3 - Estudios con microscopía electrónica**

Se fotografiaron los cultivos frescos y los polvos obtenidos por microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM) partiendo de cultivos ON frescos resuspendidos en solución PBS (pH 7,4) y fijados con glutaraldehído (de acuerdo a las instrucciones del laboratorio que ejecuta los estudios de SEM y TEM). Los cultivos frescos y deshidratados se enviaron refrigerados al Servicio de microscopía Electrónica del Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO, UNT – CONICET, Tucumán, Argentina) para la realización de los estudios SEM y TEM. El tiempo entre la cosecha y fijación de las células y el posterior procesamiento de las muestras en el INSIBIO no excedió las 18 horas.

#### **IV.2.4 - Ensayo de funcionalidad In Vitro.**

##### ***IV.2.4.1 - Resistencia a la digestión gastrointestinal simulada en las cepas en estudio***

Los cultivos overnight de las tres cepas estudiadas, obtenidos según la descripción previa, se suspendieron en leche descremada al 20% (p/v). Los polvos obtenidos fueron resuspendidos en agua destilada a una concentración de 20% (p/v) de sólidos totales. Para el estudio de resistencia a la digestión gastrointestinal simulada se

mezclaron las suspensiones celulares (20 ml) con el mismo volumen de solución “saliva – gástrica” conteniendo CaCl<sub>2</sub> (0.22 g l<sup>-1</sup>), NaCl(16.2 g l<sup>-1</sup>), KCl (2.2 g l<sup>-1</sup>), NaHCO<sub>3</sub> (1.2 g l<sup>-1</sup>) y 0.3% (p/v) de pepsina porcina (Merck, Darmstadt, Germany), y ajustado a pH a 2.50 con HCl 5 M and 1 M (Vinderola et al., 2011). Se tomaron muestras de 1 ml. inmediatamente después de mezclar (antes se ajusta el pH) y después de 30, 60 y 90 min. de incubación a 37 °C en baño de agua para realizar el recuento de lactobacilos probióticos (MRS, 37 °C, incubación aeróbica, 48 h). Finalmente, se tomó una muestra después de 90 min. (Digestión gástrica simulada), se centrifugó (6000×g, 15 min., 5 °C) y resuspendió en caldo MRS conteniendo 0.5% (p/v) de sales biliares bovinas (Sigma) a pH 7.4. Las suspensiones celulares se incubaron a 37 °C por 60 min. (shock biliar) y se realizaron recuentos después de la incubación (MRS, 37 °C, incubación aeróbica, 48 h). Los ensayos se realizaron por triplicados independientes.

#### ***IV.2.4.2 - Resistencia a la digestión gastrointestinal simulada en diferentes matrices de secado***

Se suspendieron cultivos overnight de las tres cepas estudiadas en LPD reconstituida al 20% (p/v), LPD reconstituida al 10% (p/v) + almidón al 10% (p/v) (Glutal S.A., Buenos Aires, Argentina) o LPD reconstituida al 10% (p/v) + WPC 35 al 10% (whey protein concentrate, Arla Foods Ingredients S.A., Argentina) y se secaron por spray. El almidón y el WPC son ingredientes de bajo costo y/o alta funcionalidad. El uso de almidón como carrier fue sugerida por O’Riordan et al. (2001). No se aplicó el pretratamiento térmico (PTT) antes del secado spray. Los recuentos de probióticos, antes y después del secado spray, se realizaron en agar MRS (48h, 37 °C, incubación aeróbica). Para el estudio de resistencia a la digestión gastrointestinal simulada se aplicó el procedimiento detallado en el punto anterior.

## **IV.2.5 - Ensayo de funcionalidad *in vivo***

### **IV.2.5.1. Animales utilizados**

Se trabajó con un total de 52 ratones hembra BALB/c con un peso de 18 – 20 g obtenidos del Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Los animales permanecieron en las instalaciones del bioterio del INLAIN durante una semana previo al inicio del ensayo. Cada grupo experimental consistió de 4 animales alojados juntos en cajas plásticas mantenidas en ambiente con atmósfera controlada ( $T^{\circ}$ :  $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; Humedad:  $55\% \pm 2\%$ ) con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Todos los animales recibieron simultáneamente y ad-libitum agua y una dieta balanceada convencional esterilizada (Cooperación, Buenos Aires, Argentina) conteniendo proteínas 230 g/kg; fibra cruda 60 g/kg; minerales totales 100 g/Kg; Ca 13 g/Kg; P 8 g/Kg; agua 120 g/Kg y vitaminas. Los ratones fueron mantenidos y tratados de acuerdo a la Guía Nacional del Institute of Health (NIH, USA). Los animales del ensayo fueron aprobados por el Comité de Ética para experimentación animal de la FCV, UNL (Esperanza). Se tomó en cuenta el principio de las 3R durante el trabajo con los animales.

Los ratones de los grupos “tratados” recibieron diariamente por intubación intragástrica 0,2 ml de la suspensión celular conteniendo 9,3 unidades log (UFC/ml) de la cepa bajo estudio por 5 ó 10 días consecutivos. Las cepas se administraron como cultivo ON fresco lavado y resuspendido en leche descremada al 20 % (p/v) o como cultivo secado spray en leche descremada reconstituida al 20% (p/v) de sólidos totales. En el grupo control, los ratones recibieron por intubación 0,2 ml de leche descremada al 20% por 10 días consecutivos.

#### ***IV.2.5.2. Ensayo de translocación***

Al final del período de alimentación, los animales se anestesiaron y se sacrificaron por dislocación cervical. Se extrajo el hígado y se homogeneizó en PBS estéril. Se plaquearon diluciones seriales en Agar Mc Conkey (Britania, Buenos Aires, Argentina) para la detección de enterobacterias. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. bajo condiciones aeróbicas. Los resultados se expresaron como traslocación positiva o negativa, ya que el hígado es un órgano estéril bajo condiciones normales.

#### ***IV.2.5.3. Ensayo de inmunofluorescencia para la detección de células productoras de inmunoglobulina A (IgA) en el intestino delgado.***

El intestino delgado fue extraído y procesado para la obtención de cortes histológicos. El número de células productoras de IgA se determinó sobre los cortes histológicos mediante inmunofluorescencia directa (Vinderola y col., 2005). La prueba se realizó usando Anti-IgA+ anticuerpo mono específico conjugado con FITC (Sigma). Las muestras histológicas desparafinadas se incubaron con una dilución 1/100 del anticuerpo en solución Na PBS 0,01 M (pH 7,4) por 30 minutos a 37°C. Posteriormente las muestras fueron lavadas tres veces con solución PBS y examinadas usando un microscopio de fluorescencia con lámpara de Hg. Los resultados se expresaron como la media del número de células IgA+ cada 10 campos (aumento 100 x) después de contar al menos 30 campos por duplicado para cada animal.

#### **IV.2.6 - Análisis Estadístico**

Los resultados de los recuentos celulares se transformaron a log UFC/ml y se expresaron como media  $\pm$  desvío Standard o la diferencia log de al menos tres

experimentos independientes en cada ensayo. Los datos se procesaron de acuerdo a un arreglo factorial de los tratamientos: 3 (cepas) x 2 (períodos de suministro) x 2 (formas de suministro: fresco ó deshidratado) según un diseño completo aleatorizado más un control (sin tratamiento). El modelo estadístico incluye los efectos principales y sus interacciones. Las diferencias entre tratamientos se evaluó mediante análisis de la variancia y las medias se separaron usando pruebas de significancia ( $p < 0,05$ ). El análisis estadístico y las comparaciones (ANOVA) se realizaron usando el programa estadístico Software InfoStat (Grupo InfoStat, Facultad Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).

### **IV.3. Resultados del capítulo**

En este capítulo se usaron cultivos bacterianos de 24 hs de tres cepas de lactobacilos probióticos comerciales, *L.acidophilus* A9, *L. paracasei* A13 y *L. casei* Dan., los que fueron lavados y resuspendidos en leche descremada al 20% y secados por pulverización. Los polvos obtenidos presentaron una humedad residual menor al 4% (p/v) y fueron de fácil disolución en agua destilada a temperatura ambiente. No se observaron diferencias ( $p = 0,067$ ) en los recuentos de células entre las suspensiones celulares antes del secado spray y los polvos reconstituidos obtenidos luego de la aplicación de este proceso tecnológico.

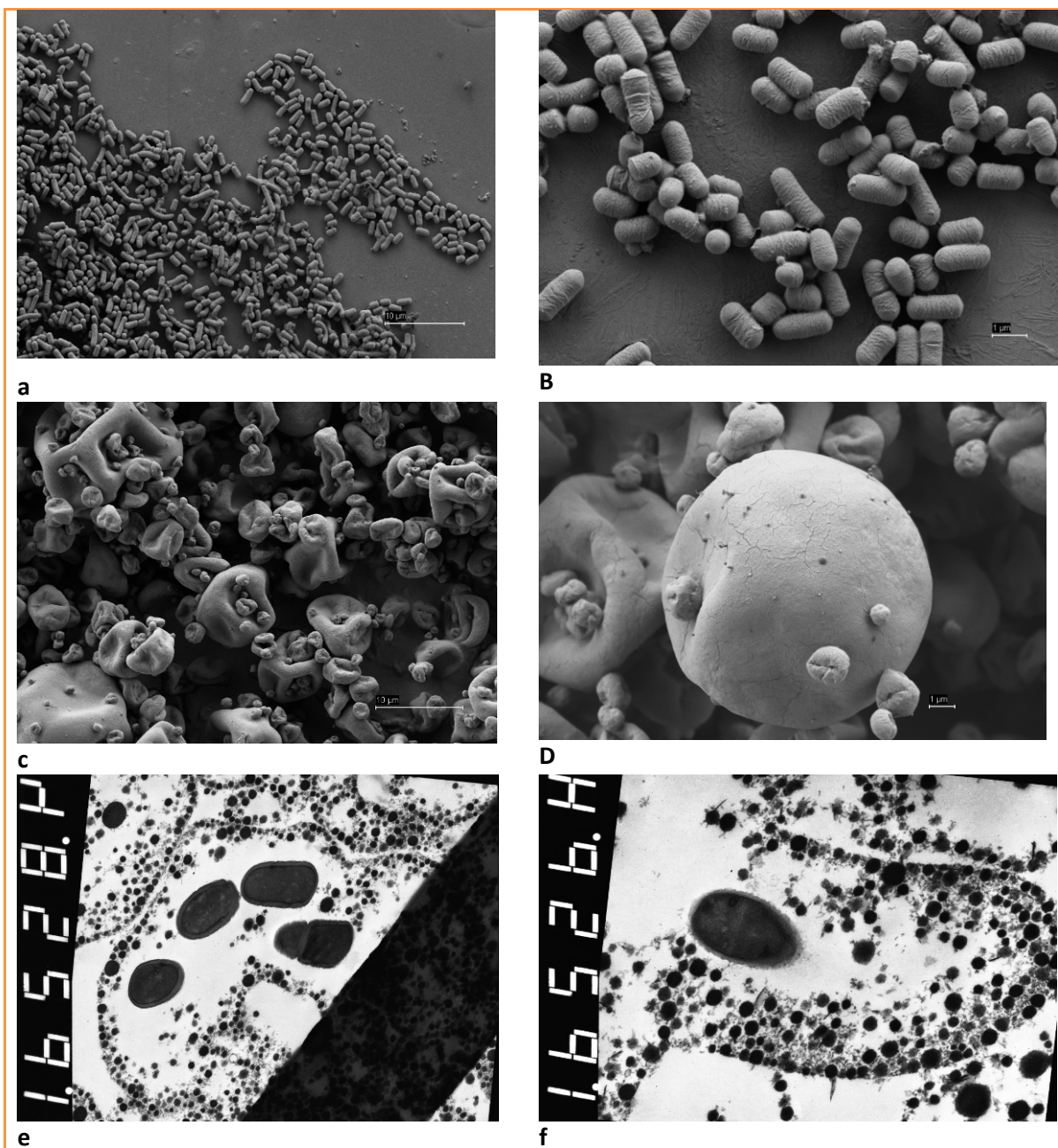
Se estudiaron los cultivos frescos y los polvos obtenidos con microscopio electrónico de transmisión y de barrido (**Fig. IV.1**). Observando la Figura IV.1 (a, b, c, d) puede verse que no quedaron células de lactobacilos fuera de las cápsulas formadas por la leche descremada luego del secado spray. Además, las imágenes de la microscopía electrónica de transmisión (Fig. IV.1e, IV.1f) obtenidas directamente de los polvos

(evitando la rehidratación de la muestra) permitió la observación de células individuales de lactobacilos dentro de cápsulas de leche descremada, rodeadas de partículas de sólidos de la leche. Se observó el mismo tipo de comportamiento para las tres cepas estudiadas.

#### **IV.3.1. Digestión gastrointestinal simulada**

Los cultivos frescos y los polvos secados en leche descremada al 20% por pulverización fueron sometidos a digestión gastrointestinal simulada que comprendió dos pasos sucesivos: digestión gástrica por 90 min y exposición a bilis por 60 min adicionales. Hubo una reducción significativa en el recuento de células, comparado con los valores iniciales, durante la digestión gastrointestinal simulada pero no así en la exposición a bilis (**Tabla IV.1**). La reducción en el recuento de células debido a la exposición a bajo pH varió de 5,31 a 6,49 ciclos log en cultivos frescos y de 4,54 a 5,34 ciclos log en cultivos secados por pulverización. En este sentido puede verse que el secado spray aumentó significativamente la resistencia de *L. casei* A13 y *L. paracasei* Dan en aproximadamente 1 y 2 ciclos log, respectivamente.





**Figura IV.1.** Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM) de *Lactobacillus casei* A13 antes (a y b) y después (c, d, e, f) del secado por atomización en leche descremada. Las flechas negras en las imágenes e y f indican la superficie externa de los glóbulos observados en las imágenes c y d. Las flechas blancas en e y f indica las células de lactobacilos.

**Tabla IV.1.** Resistencia a la digestión gástrica simulada y a la exposición a bilis de lactobacilos en estado fresco o deshidratado en leche descremada.

Cepa	Condición	Recuento células (log UFC mL <sup>-1</sup> ) a tiempo (min)			Reducción en ciclos log por digestión gástrica <sup>3</sup>	Incremento viabilidad celular por secado spray <sup>4</sup>
		0	90 (digestion gástrica)	150 (exposición a bilis)		
<i>L. casei</i> Dan	Fresco	8.58 ± 0.57 <sup>a,1</sup>	2.09 ± 0.17 <sup>a,2</sup>	2.00 ± 0.11 <sup>a,2</sup>	6.49	1.95
	Deshidratado	8.42 ± 0.58 <sup>a,1</sup>	3.88 ± 0.14 <sup>b,2</sup>	3.84 ± 0.35 <sup>b,2</sup>	4.54	
<i>L. acidophilus</i> A9	Fresco	8.69 ± 0.14 <sup>a,1</sup>	3.38 ± 0.65 <sup>a,2</sup>	2.86 ± 0.68 <sup>a,2</sup>	5.31	0.03
	Deshidratado	8.90 ± 0.17 <sup>a,1</sup>	3.56 ± 0.49 <sup>a,2</sup>	3.66 ± 0.10 <sup>a,2</sup>	5.34	
<i>L. paracasei</i> A13	Fresco	8.60 ± 0.53 <sup>a,1</sup>	2.45 ± 0.78 <sup>a,2</sup>	2.36 ± 0.32 <sup>a,2</sup>	6.15	0.96
	Deshidratado	9.19 ± 0.15 <sup>a,1</sup>	4.05 ± 0.25 <sup>b,2</sup>	3.99 ± 0.16 <sup>b,2</sup>	5.19	

<sup>a,b</sup> Valores en columnas, para la misma cepa, con letras distintas son significativamente diferentes (P<0.05).

<sup>1,2</sup> Valores en filas con diferentes números son significativamente diferentes (P < 0.05).

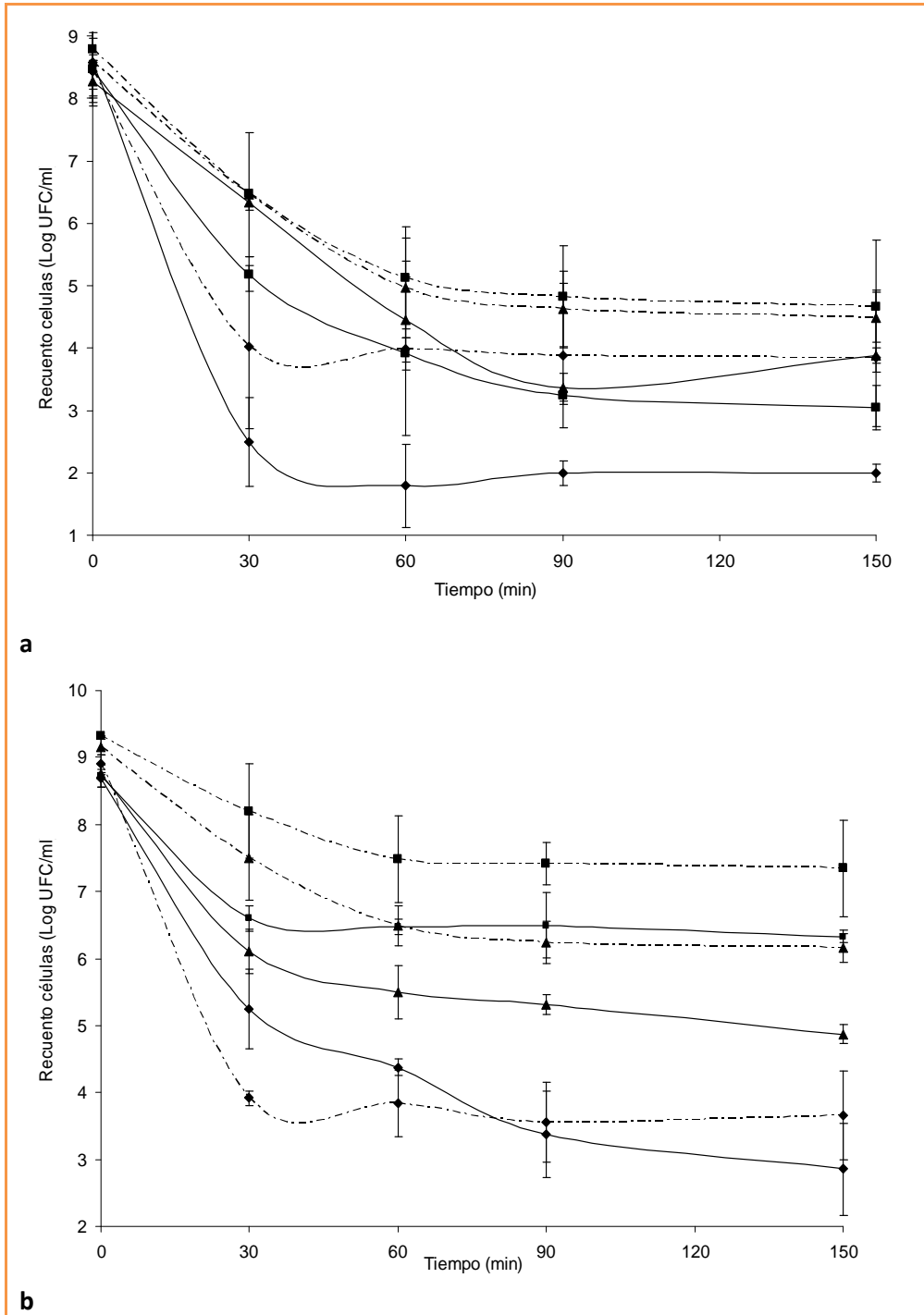
<sup>3</sup> Diferencias entre recuentos de células promedio a tiempo 0 y recuento de células promedio después de la digestión gástrica simulada (90 min), realizados en cada fila.

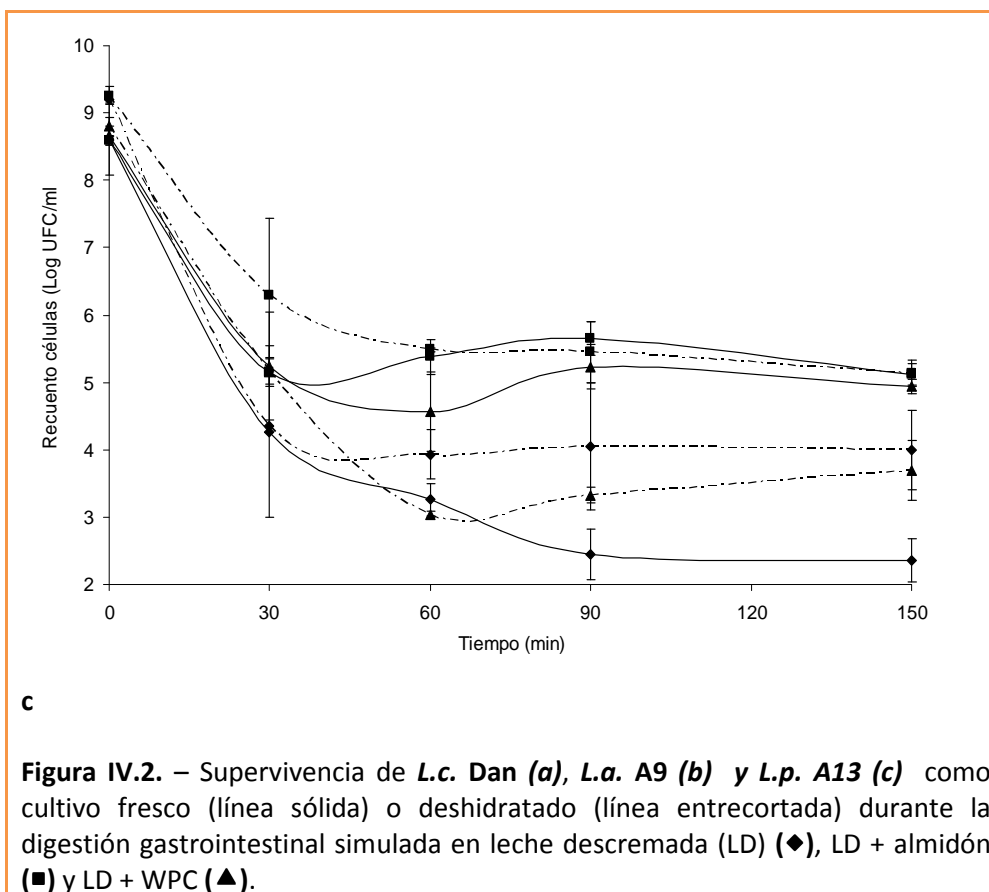
<sup>4</sup> Diferencias entre reducción promedio en recuentos de células como cultivo fresco y reducción promedio de células deshidratadas, después de la digestión gástrica simulada.

### ***IV.3.2. Digestibilidad en diferentes matrices soporte***

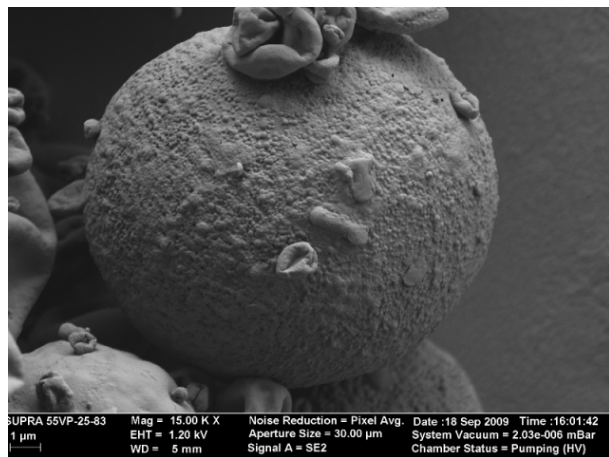
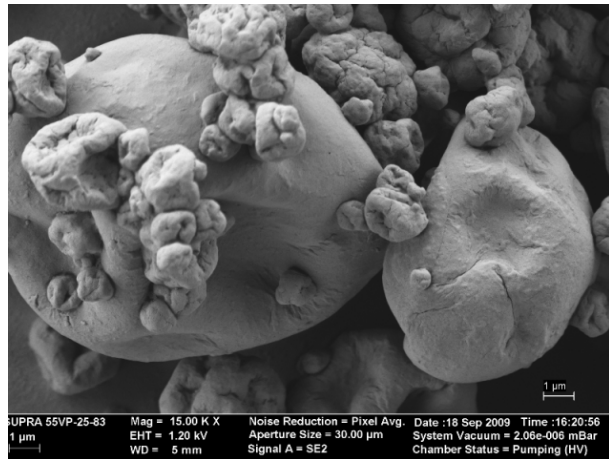
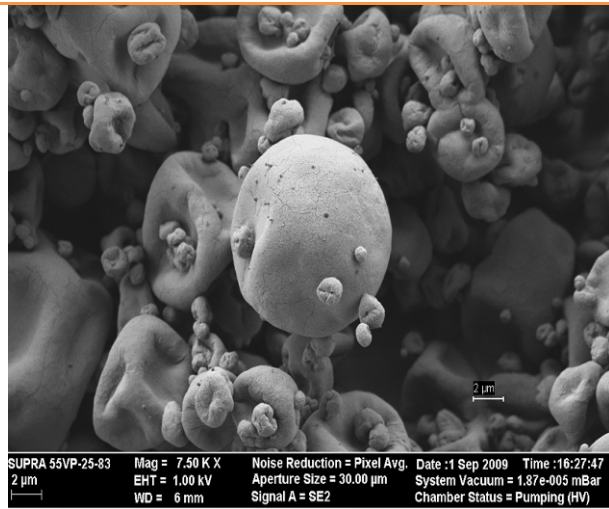
Cuando se llevó a cabo la digestión gastrointestinal simulada de las cepas alternado la matriz láctea original, se verificó que la capacidad de supervivencia dependía de las matrices de secado y de si las células fueron digeridas como cultivos frescos o secados por pulverización (**Fig. IV.2a, IV.2b y IV.2c**). Al final de la digestión gastrointestinal simulada (150 min.), el recuento de células de *L. paracasei* A13 secadas por pulverización fue aproximadamente 1,5 ordenes log superior a aquellas correspondientes al cultivo fresco, ambas en leche descremada reconstituida al 20% (p/v). No se observaron diferencias entre los cultivos secados por pulverización y los cultivos frescos cuando la cepa estaba deshidratada o suspendida en leche descremada + almidón. Sin embargo, se observó un recuento celular disminuido en la cepa secada por pulverización en leche descremada + WPC.

Al final de la digestión gastrointestinal simulada (150 min.), los recuentos de células de *L.acidophilus* A9 y *L. casei* Dan secadas por pulverización fueron significativamente más altos que aquellos correspondientes a cultivos frescos, independientemente de la matriz de alimentos utilizada. El incremento de la supervivencia durante la digestión gastrointestinal debido al secado spray tuvo un rango aproximado de 0,8 y 2 órdenes log.





Como parte de este ensayo se realizó el análisis de imágenes mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar la morfología de las partículas microencapsuladas en cada una de las matrices. En las **Figura IV.3** se observa la diferente estructura superficial de las microcápsulas, sobre todo cuando se utiliza almidón. La microscopía electrónica evidenció la formación de glóbulos que entramparon a las cepas, sin observarse células fuera de éstos (SEM).



**Figura IV.3.** Micrografías SEM de la cepa *L.c.* Dan como cultivo fresco y deshidratado en LPD al 20% (a), LPD al 20% + WPC (b) y LPD al 20% + almidón (c).

### **IV.3.3. Ensayo *in vivo***

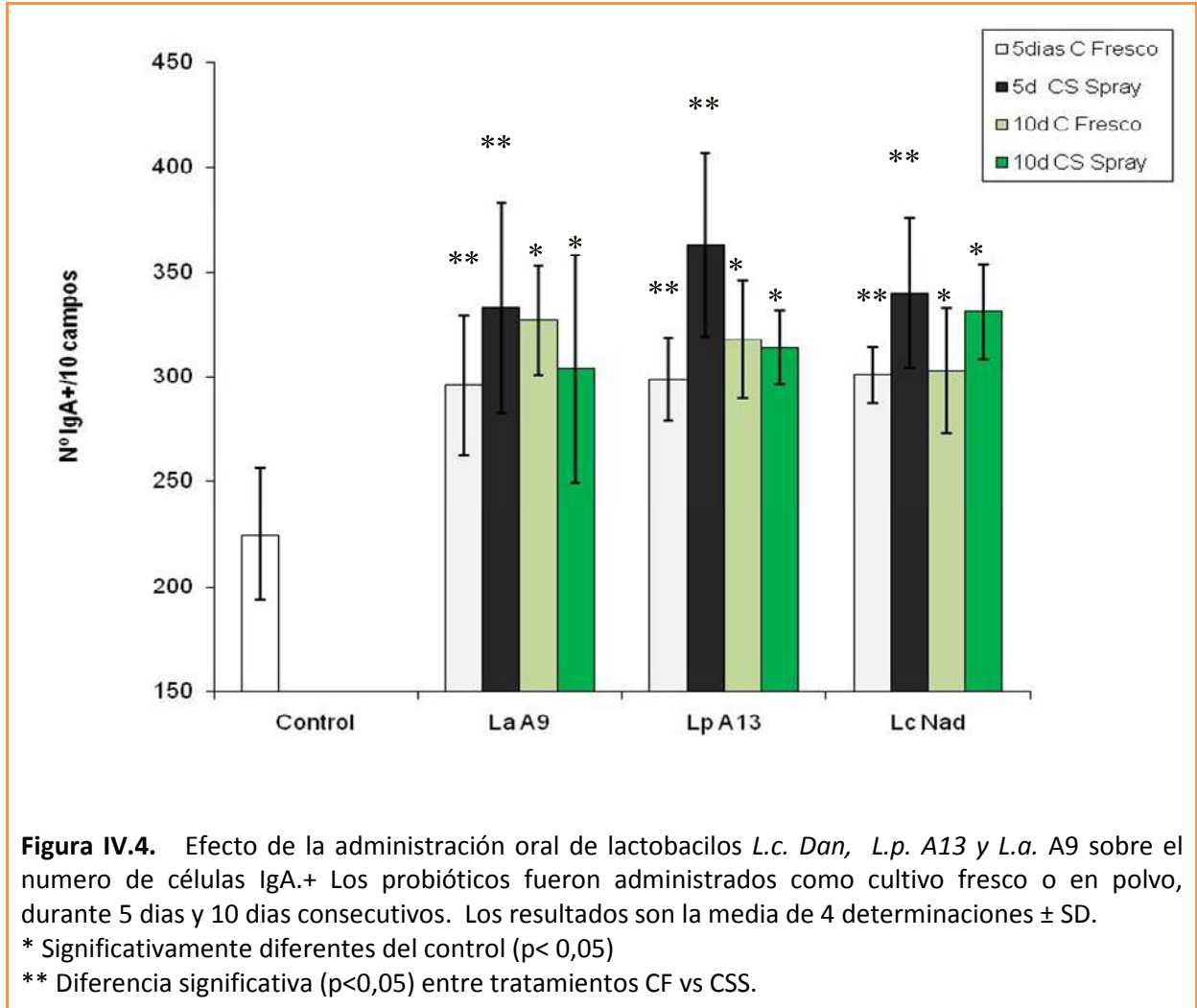
Finalmente, se llevó a cabo un ensayo *in vivo* con ratones para determinar el efecto del secado spray en la capacidad inmunoestimulante de la cepa en estudio.

La activación de la respuesta inmune se evaluó mediante el número de células productoras de IgA en lámina propia de intestino delgado (medida de la respuesta inmune local). La IgA es la principal inmunoglobulina en la superficie del intestino, y su función principal es ejercer la exclusión inmune de bacterias patógenas o virus por la cooperación íntima con los mecanismos de defensa no específicos (Brandtzaeg et al., 1987). Como un rasgo funcional, la capacidad innata de la IgA de mejorar la mucosa en el intestino después de la administración oral es un atributo deseable para las bacterias probióticas (Galdeano et al. 2009).

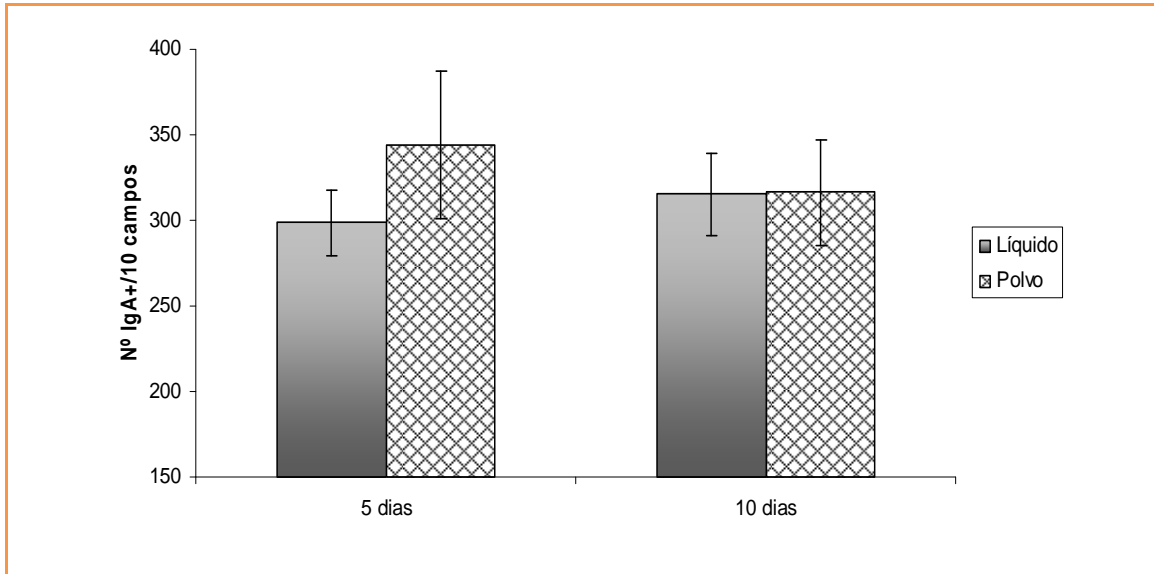
La administración oral de la cepa no indujo translocación de la flora intestinal al hígado, por lo tanto la dosis usada en este estudio fue considerada segura para este modelo animal.

La **Figura IV.4** muestra los efectos de la administración oral de la cepa en estudio, por 5 o 10 días consecutivos, en el número de células productoras de IgA de la lámina propia en el intestino delgado de ratón. Todas las cepas utilizadas fueron efectivas en aumentar significativamente ( $p < 0,05$ ) este parámetro de funcionalidad en ambos períodos de alimentación evaluados cuando se administraron como cultivos secados por pulverización, comparados con los valores observados en el grupo control. En relación con el tratamiento tecnológico aplicado (secado spray), un número significativamente elevado de células productoras de IgA fue inducido por cultivos secados por pulverización en comparación con cultivos frescos, en las tres cepas, cuando se administró por 5 días (**Fig. IV.5**).

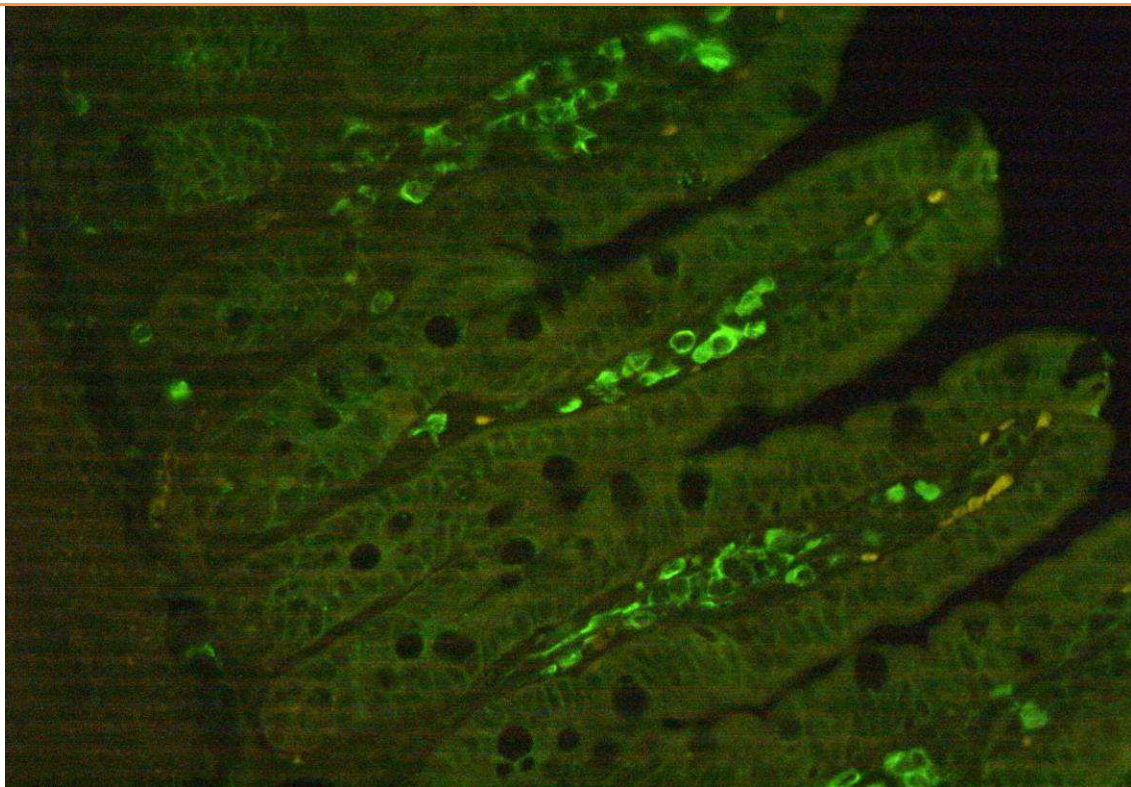
En la **Figura IV.6** se observa una foto de cortes histológicos de intestino delgado, donde las células IgA+ están identificadas por fluorescencia.







**Figura IV.5.** Efecto de los días de administración oral de lactobacilos sobre el número de células IgA+. Los probióticos fueron administrados como cultivo fresco o en polvo, durante 5 días y 10 días consecutivos. Los resultados son la media de 10 determinaciones  $\pm$  SD.



**Figura IV.6.** Cortes histológicos de intestino delgado. Células IgA+ identificadas por fluorescencia.

#### IV.4. Discusión

Cuando se trata de producir cultivos probióticos a nivel industrial, dos tecnologías dominan el mercado: liofilización y congelación. El secado spray, como tecnología alternativa para este propósito, tendría la ventaja de la rapidez y el costo relativamente bajo si se lo compara con la liofilización. Además, el secado spray ya está disponible para la aplicación industrial comparado con otras técnicas de microencapsulación (Burgain et al., 2011). Sin embargo, una de las desventajas del secado spray es el riesgo de muerte celular asociada con el uso de altas temperaturas que no siempre son compatibles con la supervivencia de todas las cepas de bacterias (Burgain et al., 2011). De todas maneras, el secado spray ha sido usado satisfactoriamente para la fabricación de medios basados en leche descremada en polvo con alto número de bacterias viables de diferentes especies (Gardiner et al., 2000; O`Riordan et al., 2001; Simpson et al., 2005; Lian et al., 2002, Páez et al., 2012). En este estudio, tres cepas de bacterias probióticas actualmente usadas en productos lácteos fermentados, fueron secadas por pulverización en leche descremada y los polvos obtenidos fueron caracterizados por microscopía electrónica. La resistencia a la digestión gastrointestinal simulada fue estudiada junto con la capacidad de la cepa para aumentar el número de células productoras de IgA en la lámina propia del intestino delgado de ratón como indicador de funcionalidad a nivel animal.

Los **estudios de microscopía electrónica** permitieron observar que las células de lactobacilos fueron atrapadas exitosamente dentro de las microcápsulas formadas a partir de los sólidos de la leche, sin dejar células afuera. Estas micropartículas obtenidas fueron esféricas y de tamaños variables. Su superficie tenía apariencia granulosa con grietas visibles. Lian et al. (2002) sugirió que estas grietas podrían

facilitar la salida del calor desde adentro de las partículas luego del secado, causando menor daño por calor a los microorganismos atrapados y contribuyendo así, a la supervivencia al secado spray. Gardiner et al. (2002) revelaron la presencia de células de *L. paracasei* NFBC 338 dentro de leche descremada en polvo secada por pulverización usando microscopía laser confocal de barrido. No se observaron células de esta cepa fuera de la leche descremada en polvo secada por pulverización (Gardiner et al., 2002) o leche descremada en polvo con goma arábica (Desmond et al., 2002 b), como se observó en micrografías de SEM. Asimismo, estudios de microscopía por transmisión electrónica (TEM) con *L. paracasei* NFBC 338 (Meng et al., 2008) mostraron que las células estaban rodeadas por sólidos de la leche, como también se observó en este estudio. Micrografías de microcápsulas de *Bifidobacteria animalis* spp. *lactis* BB- 12 producidas con leche descremada o leche descremada combinada con inulina u oligofructosa mostraron también la ausencia de células fuera de las partículas obtenidas por pulverización (Fritzen-Freire et al., 2011). Lian et al. (2002) mostraron a través de SEM que *B. longum* B6 fue secado exitosamente por pulverización dentro de micropartículas de goma arábica, gelatina, almidón soluble y leche descremada. O’Riordan et al. (2001) entramparon células de *Bifidobacterium* PL1 en almidón por secado spray, no dejando evidencia de células fuera de las partículas. Finalmente, Semyonov et al. (2011) reportaron la encapsulación de *L. casei* spp. *paracasei* LMG P-21380 en una matriz de maltodextrina-trehalosa con secador por pulverización ultrasónico al vacío, una modificación del secado spray que utiliza condiciones menos extremas y aumenta la viabilidad celular después del secado. Las imágenes de TEM de las microcápsulas producidas también mostraron la exitosa incorporación de células

dentro de las partículas. Todas estas evidencias visuales en conjunto sugieren que el secado spray es efectivo para atrapar células viables y aislarlas del medio circundante. En este estudio, el secado spray en leche descremada no afectó la viabilidad de las células. Sin embargo, fueron puestas en evidencia diferencias en la **resistencia a la digestión gastrointestinal** simulada en cultivos frescos cuando se compararon con cultivos secados por pulverización. La resistencia a la digestión gástrica simulada fue mejorada a través del secado spray en *L.c.* Dan y *L.p.* A13. Además, al modificar la matriz de secado, la resistencia a la digestión gastrointestinal simulada fue aumentada por el secado spray en *L.a.* A9 y en *L.c.* Dan en todas las matrices evaluadas y en *L.p.* A13 sólo en leche descremada.

Los resultados obtenidos coinciden con los de Fávaro-Trindade y Grosso (2002) quienes muestran una supervivencia aumentada en *L. acidophilus* La-05 and *B. lactis* Bb-12 secados por pulverización en ftalato acetato de celulosa, cuando se expusieron a un pH bajo y a bilis. Sin embargo, esto podría depender de las cepas y las condiciones ya que O’Riordan et al. (2001) informaron que no se presentaron diferencias en la resistencia a las condiciones ácidas entre bifidobacterias libres o recubiertas de almidón secadas por pulverización.

Una resistencia aumentada a factores de estrés (pH bajo) podría lograrse con una exposición previa a bajos niveles de otros factores de estrés (secado spray), un fenómeno llamado adaptación cruzada que ha sido anteriormente reportado en cepas de lactobacilos expuestas a diferentes factores de estrés (Lou & Yousef, 1996; O’Driscoll et al., 1996).

Recientemente ha sido demostrado que la matriz alimenticia en la que los probióticos son incluidos tiene un papel decisivo para determinar la viabilidad y funcionalidad

durante la fabricación del producto y de la protección de las células hasta el consumo (Ranadheera et al., 2010). En línea con estos hallazgos, se reportó que la resistencia a condiciones de acidez en bacterias probióticas podría también estar condicionada por la matriz alimenticia (Saarela et al., 2006; Vinderola et al., 2011 a), el pH en el cual las células crecen (Saarela et al., 2009; Vinderola et al., 2011b), el momento en el que la biomasa es cosechada (Saarela et al., 2005), el protector usado (Desmond et al., 2002a,b; Saarela et al., 2005; Vinderola et al., 2011b) o el período de almacenamiento (Matto et al., 2006; Vinderola et al., 2012).

De acuerdo a lo analizado en la literatura, esta es la primera información sobre la capacidad del secado spray para modificar la resistencia en lactobacilos a la digestión gastrointestinal simulada.

Finalmente, un **ensayo *in vivo*** en ratones fue llevado a cabo para evaluar la capacidad inmunoestimulante de las cepas cuando se administran como cultivos frescos o secados por pulverización. La inmunoglobulina A (IgA) es la inmunoglobulina más abundante en la superficie de las mucosas cuya función principal en los intestinos es la de ejercer exclusión inmune mediante cooperación íntima con los mecanismos de defensa no específicos (Macpherson et al., 2001). Numerosos trabajos indican proliferación de IgA+ en intestino, en modelo animal (Vinderola et al. 2007, Chiang and Pan, 2012; Souza et al., 2012) o en humanos (Kabeerdoss et al., 2011; Holscher et al., 2012), como indicador deseable de funcionalidad. En este estudio el secado spray no modificó negativamente la capacidad de las cepas para aumentar el número de células productoras de IgA. Resulta interesante que en el período de 5 días de administración, la capacidad de producir proliferación de IgA+ de los cultivos secados por pulverización fue mayor que la de los cultivos frescos.

En un estudio previo, Burns et al., 2010 observaron que péptidos secados por pulverización indujeron un número mayor de células productoras de IgA en ratones. Puede formularse la hipótesis de que la exposición al calor de la capa externa de proteínas del lactobacilo podría, de alguna manera, haber inducido agregados de proteínas que podrían haberse comportado in vivo mayormente como antígenos particulados en lugar de antígenos solubles, aumentando su capacidad de interacción con las células inmunes asociadas al intestino (Perdigón et al., 2002). Otro tratamiento tecnológico consistente en la aplicación de niveles subletales de alta presión (llamado Homogeneización a Alta Temperatura) también aumentó significativamente la capacidad de *L. paracasei* A13 para inducir la proliferación de células productoras de IgA comparado con células no tratadas (Tabanelli et al., 2012).

#### **IV.5. Conclusiones del capítulo**

A nivel del laboratorio, el secado spray es una herramienta tecnológica promisoría para el desarrollo de cultivos probióticos en leche descremada cuando las cepas son capaces de superar el tratamiento térmico involucrado en la deshidratación.

**La aplicación del secado spray fue efectiva para mejorar la funcionalidad de las cepas. La resistencia a la digestión gastrointestinal simulada y la capacidad inmunoestimulante se incrementaron con el secado spray dependiendo de la cepa.**

El escalado del secado de cepas probióticas es aún necesario para verificar si los altos rendimientos de células viables con propiedades mejoradas *in vitro* e *in vivo* se mantienen a nivel industrial. Las cepas microencapsuladas por secado spray en leche descremada demostraron un buen potencial para su uso en alimentos funcionales.

Se observó además la importancia de los estudios *in vivo* para ratificar o rectificar los resultados *in vitro*. Este es el primer informe que indica el efecto del secado spray en la capacidad inmunoestimulante de las bacterias probióticas *in vivo*.

# *Capítulo V.*

## *Incorporación de probióticos deshidratados en alimentos.*

---





## **V.1. Objetivos**

El primer objetivo de este ensayo fue evaluar la supervivencia durante el período de consumo de los probióticos deshidratados por secado spray incorporados a distintas matrices alimentarias sólidas y líquidas con diferentes pH.

El objetivo final de esta tesis fue desarrollar un nuevo alimento funcional deshidratado llamado "**Leche alfa – Bio**", utilizando leche entera en polvo (LEP) enriquecida naturalmente en compuestos antioxidantes y ácidos grasos benéficos para la salud humana, como medio para incorporar los probióticos deshidratados. En dicho alimento funcional se evaluará la supervivencia durante el almacenamiento de los cultivos probióticos deshidratados adicionados.

## **V.2. Materiales y Métodos**

### **V.2.1 - Prueba de adición en alimentos**

Para la prueba de adición en alimentos se utilizó el polvo obtenido por la deshidratación de las cepas **L.p. A13, L.a. A9 y L.c. Dan** suspendidas en LPD al 20%, fraccionado en sobres bilaminados de 1 g. Se realizó la evaluación microbiológica para garantizar la seguridad de los mismos.

Para la adición en alimentos líquidos primero se rehidrató 1 g de la cepa deshidratada en 5 ml de agua destilada a 37°C, se dejó reposar 30 minutos según las recomendaciones sugeridas por Champagne et al., (2011) y se adicionó a 95 ml del alimento líquido, se homogenizó con agitador magnético y se mantuvo unos minutos en reposo antes de preparar las diluciones para la siembra.

Los alimentos líquidos de diversas marcas comerciales a los que se adicionó el concentrado probiótico deshidratado fueron: agua estéril, agua envasada de mesa,

leche entera UHT, leche chocolatada y bebida láctea adicionada con jugos de fruta (sabor durazno). Se evaluó la supervivencia del probiótico inmediatamente después y luego de 30 y 60 minutos desde el momento de la adición.

Los alimentos sólidos a los que se agregó el concentrado probiótico deshidratado fueron: fórmula infantil en polvo, gelatina, alimento para bebés en base a cereales. El probiótico en polvo se adicionó al 10% (p/p) en el alimento. El alimento se preparó o se reconstituyó según las indicaciones del fabricante en el envase. Del alimento preparado se tomaron las muestras para los análisis. Se evaluó supervivencia del probiótico asumiendo el consumo del alimento inmediatamente después de su preparación. En todos los casos se evaluó el pH del alimento. Se realizaron dos repeticiones por cada cepa para cada alimento evaluado.

### ***V.2.2 - Leche alfa - bio***

Para la elaboración de la leche en polvo alta en antioxidantes y ácidos grasos W3 ***“LEP alfa”*** se utilizó leche proveniente de un ensayo controlado llevado a cabo en el Tambo Experimental de la EEA Rafaela del INTA. La misma fue producida por vacas alimentadas con un mínimo de 35% y un máximo de 70% de alfalfa en la dieta, lo que garantizó elevados niveles de vitaminas antioxidantes y ácidos grasos omega 3 (Taverna 2011a). Las vitaminas antioxidantes liposolubles como el alfa tocoferol y los ácidos grasos omega3 están naturalmente presentes en la pastura de alfalfa, se transfieren a la leche y permanecen en la LEP. Estos compuestos por sí mismos ya le confieren características funcionales a la leche en polvo. La misma fue elaborada en un secadero spray NIRO Atomizer escala piloto (100 l) perteneciente a una empresa láctea. Las muestras de polvo recién elaboradas envasadas en sobres bilaminados se

analizaron para determinar los parámetros físicoquímicos (humedad, grasa, proteínas totales, grasa libre, acidez), perfil de ácidos grasos (AG), perfil de minerales y vitaminas antioxidantes por métodos normalizados (Taverna et al., 2011b).

La selección de la cepa deshidratada se realizó en función a los resultados previos presentados en los Capítulos III y IV de supervivencia post spray y durante su conservación a temperatura ambiente. La cepa *L.p.A13* deshidratada con una concentración promedio de  $1 \times 10^{10}$  UFC/g se utilizó para adicionar a la LEP.

Se prepararon 2 mezclas de LEP con distintas proporciones de probiótico adicionado: M1=2% (p/p) y M2=10% (p/p). Las mezclas con LEP se homogeneizaron primero manualmente (por inversión 20 veces) y luego con stomacher durante 1 minuto, se prepararon alícuotas de 10 g y se envasaron al vacío. Las mismas se conservaron a 25°C durante 120 días. Se evaluó la supervivencia de la cepa probiótica cada 30 días.

### ***V.2.3 Análisis Estadísticos***

El análisis de la varianza realizado consistió en un análisis factorial con medidas repetidas en el tiempo. El análisis estadístico y las comparaciones (ANOVA) se realizaron usando el programa estadístico Software InfoStat (Grupo InfoStat, Facultad Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).

### V.3. Resultados

#### V.3.1. Adición en alimentos como suplemento alimenticio

Los alimentos son considerados el vehículo ideal para la incorporación de las bacterias probióticas al tracto gastrointestinal humano (Ross et al., 2002). Los productos lácteos son los más utilizados para este fin. Sin embargo, limitaciones tales como la presencia de alérgenos y el requerimiento de cadena de frío, así como la creciente demanda de nuevos alimentos funcionales ha dado lugar al desarrollo de alimentos probióticos no lácteos. Diversos factores tales como el contenido de grasa, la concentración y el tipo de proteínas, los azúcares y el pH, pueden afectar el crecimiento y la supervivencia del probiótico en el alimento.

Los suplementos con una o más cepas de diferentes bacterias probióticas deshidratadas, son un formato frecuentemente encontrado de venta directa a los consumidores. Estos suplementos generalmente se pueden presentar: como cápsulas, comprimidos o polvo envasado en saquitos, entre otros formatos (Champagne et al, 2011). Algunas de estas variantes son de consumo directo y otras son una opción que permite flexibilizar la utilización ya que se puede adicionar a diversas matrices alimentarias. En este estudio se utilizó este último formato, fraccionando el polvo obtenido por la deshidratación de las cepas *L.p.* A13, *L.a.* A9 y *L.c.* Dan suspendidas en LPD al 20%, en sobres bilaminados de 1 g., con una concentración promedio de  $5 \times 10^9$  UFC/g. para la adición en diversas matrices alimentarias.

Antes de fraccionarlo, envasarlo y adicionarlo a los alimentos se realizó el control de humedad y microbiológico del suplemento probiótico deshidratado (**Tabla V.1**). Los sobres se abrieron manualmente en condiciones asépticas y se utilizó el total de su contenido para su rehidratación y posterior incorporación al alimento. El

procedimiento de rehidratación de los probióticos se realizó siguiendo las recomendaciones de Champagne et al. (2011). Los alimentos comerciales líquidos y sólidos a los que se incorporó el probiótico deshidratado, se seleccionaron tratando de cubrir un rango de pH amplio (**Tabla V.2**). Las condiciones de adición del aditivo en polvo a una porción de alimento de 100 ml. de líquido o 10 g. de sólido, se realizaron en forma similar a las que utilizaría un consumidor.

**Tabla V.1.** Humedad y parámetros microbiológicos de los concentrados probióticos deshidratados.

	<b>Lc Dan</b>	<b>La A9</b>	<b>L.p. A13</b>
Humedad (%)	3,80	4,45	3,50
<b>Control microbiológico</b>			
• Rto. Probióticos *	3,9 x 10 <sup>8</sup> UFC/ml	2,3 x 10 <sup>8</sup> UFC/ml	6,9 x 10 <sup>8</sup> UFC/ml
• Coliformes a 30°C:	< 10 UFC/ml.	< 10 UFC/ml.	< 10 UFC/ml.
• Coliformes a 45°C:	< 3 NMP/100 ml.	< 3 NMP/100 ml.	< 3 NMP/100 ml.
• <i>Staphylococcus aureus</i> :	< 10 <i>St. aureus</i> coag. positiva/ g	< 10 <i>St. aureus</i> coag. positiva/ g	< 10 <i>St. aureus</i> coag. positiva/ g
• <i>Salmonella</i> spp:	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g

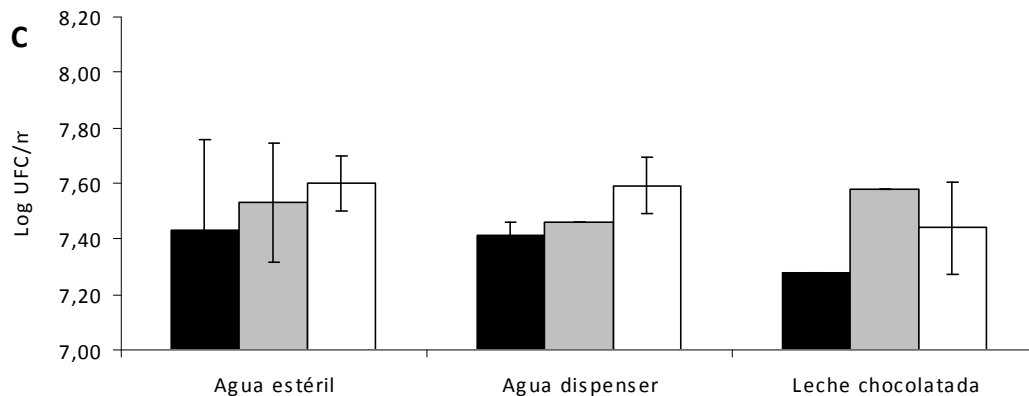
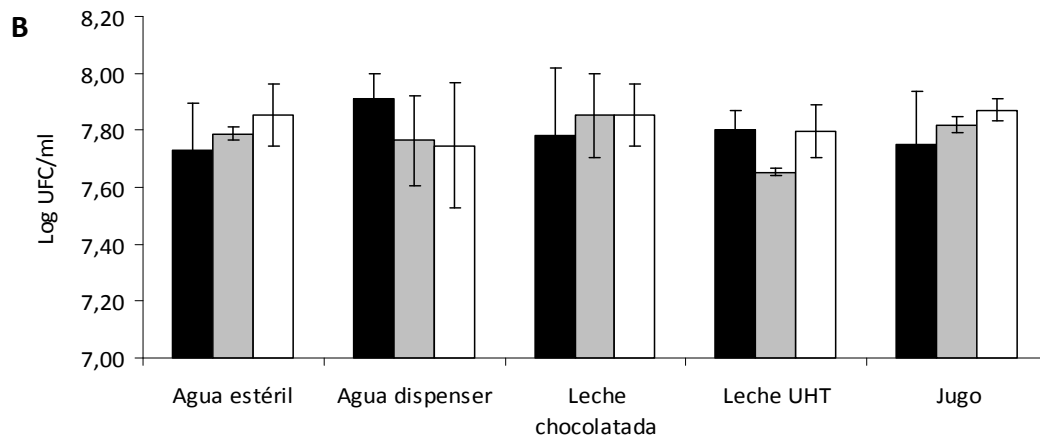
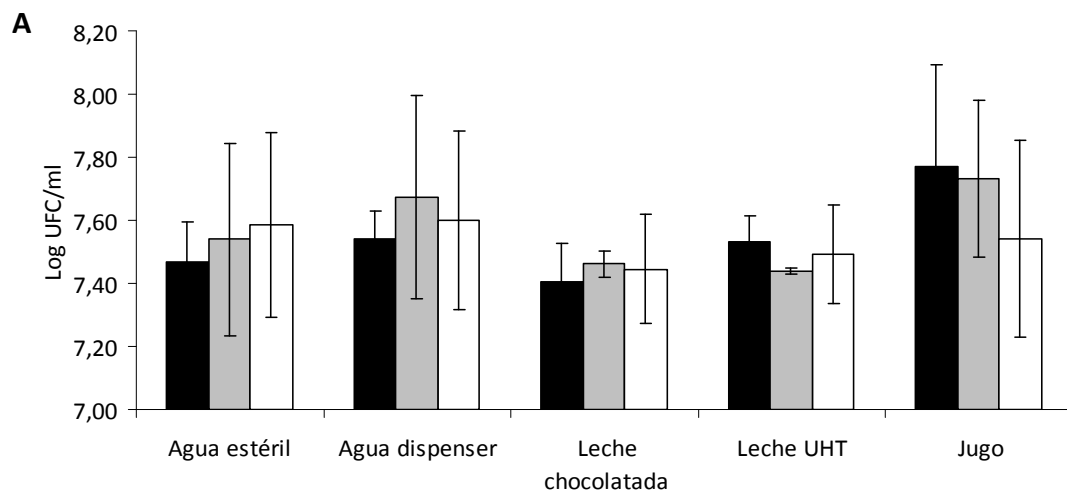
\*Los polvos producidos fueron reconstituidos al volumen de líquido original para la enumeración de células viables después del secado spray.

**Tabla V.2.** Concentración inicial de células en el aditivo probiótico y pH de los alimentos líquidos utilizados.

	pH	Viabilidad (log UFC/ml)		
		L.c. Dan	L.p. A13	L.a. A9
<b>Aditivo probiótico en polvo*</b>		<b>8,57</b>	<b>8,84</b>	<b>8,86</b>
<b>Alimentos adicionados</b>				
A – Agua estéril	8,26			
B - Agua de mesa	7,95			
C - Leche UHT	6,72			
D - Leche chocolatada	6,63			
E - Bebida láctea con jugo de frutas	4,06			

\*Los polvos producidos fueron reconstituidos al volumen de líquido original para la enumeración de células viables después del secado spray.

Los resultados de viabilidad de los probióticos adicionados en alimentos líquidos a tiempo 0, 30 y 60 minutos se muestran en la **Figura V.1**. No hubo diferencias significativas en los recuentos a los diferentes tiempos evaluados para una misma cepa y un mismo alimento. Esto implica que la viabilidad de cada cepa probiótica adicionada fue similar en matrices alimentarias líquidas con diferentes composiciones y pH que oscilaron entre 4 y 8 y que dicha viabilidad se mantuvo al menos por una hora después de la adición en cada uno de alimentos ensayados.



**Figura V.1.** Viabilidad de *L.p.* A13 (A), *La* A9 (B) y *Lc* Dan (C) en alimentos adicionados a tiempo 0 (negro), 30 (gris) y 60 (blanco) minutos después del agregado en agua estéril, agua envasada de mesa, leche UHT, leche chocolatada y bebida láctea. Los valores representan las medias y desvíos de dos ensayos independientes.

Los resultados de viabilidad de los probióticos adicionados en alimentos sólidos se muestran en la **Tabla V.3.**

**Tabla V.3.** Concentración inicial de células en el aditivo probiótico y pH de los alimentos sólidos utilizados.

	<i>pH</i>	<i>Viabilidad (log UFC/ml)</i>		
		<i>L.c. Dan</i>	<i>L.p. A13</i>	<i>L.a. A9</i>
<b><i>Aditivo probiótico en polvo*</i></b>		<b><i>9,11</i></b>	<b><i>9,70</i></b>	<b><i>10,04</i></b>
<b><i>Alimentos adicionados **</i></b>				
<i>Gelatina</i>	3,55	7,32	7,85	7,96
<i>Nestum</i>	6,25	7,41	8,57	8,15
<i>Fórmula infantil</i>	6,70	7,71	8,89	8,23

\*Los polvos producidos fueron reconstituidos al volumen de líquido original para la enumeración de células viables después del secado spray.

\*\*Los recuentos se realizan en el alimento reconstituido según las indicaciones del fabricante.

A diferencia de lo que sucedió en los alimentos líquidos, en las matrices sólidas se observó una tendencia a menores recuentos en los alimentos con pH más ácido para todas las cepas ensayadas.

En todos los casos de adición del suplemento probiótico deshidratado el nivel de microorganismos viables en el alimento alcanzó la concentración umbral recomendada ( $1 \times 10^7$  UFC/g o ml) para una mejor eficacia en la regulación de los efectos benéficos (Vinderola & Reinheimer, 2000; Gardiner et al., 2002).



### **V.3.2 Leche en polvo *alfa-BIO*: Producto lácteo probiótico en polvo enriquecido naturalmente en compuestos nutraceuticos**

La leche entera en polvo tiene un importante aporte sobre el total de las exportaciones de nuestro país, representando el 70 % de las mismas. Los desarrollos en el área de lácteos avanzan hacia la creación de productos e ingredientes más saludables, funcionales y diferenciados. La inclusión de probióticos resultó en una exitosa estrategia para desarrollar este tipo de alimentos. Particularmente en nuestro país, la gran mayoría de productos que los contienen son las leches fermentadas elaboradas con bacterias lácticas termófilas y el primer queso fresco probiótico desarrollado en Argentina (BIOQUESO) por parte del grupo de trabajo del INLAIN – CONICET – UNL y una empresa de la región (Suc. de Alfredo Williner S.A.) (Vinderola et al., 2000; Vinderola et al., 2009)

En el mercado mundial de alimentos funcionales existen pocos alimentos deshidratados adicionados con probióticos, por ejemplo cereales para el desayuno, fórmulas infantiles y otras formulaciones en base a leche en polvo (Champagne et al, 2011). Existe particular interés en el desarrollo de diversos productos lácteos deshidratados que contengan bacterias probióticas destinadas a niños y otros segmentos poblacionales con alto riesgo en la salud (FAO/WHO, 2001), y la leche en polvo resulta un producto interesante para acceder a los mismos.

En tal sentido y en respuesta a la necesidad de incorporación de valor agregado al principal producto de exportación de Argentina, se planteó en este trabajo de Tesis contribuir al desarrollo y evaluación de la estabilidad de leche entera en polvo

adicionada con bacterias probióticas microencapsuladas, elaborada a partir de leche producida en sistemas pastoriles.

La especie forrajera es uno de los elementos propios de una región que pueden intervenir en procesos de diferenciación de alimentos. En los sistemas productivos argentinos, la pastura de alfalfa es utilizada en pastoreo directo todo el año, y el aporte de esta especie varía entre un 20 y 80% de la materia seca de la dieta dependiendo del sistema y de la estación del año. Con el objetivo de poner en evidencia el efecto de la pastura de alfalfa sobre las propiedades funcionales de la leche y productos lácteos, se realizaron numerosos ensayos en INTA EEA Rafaela donde se compararon dietas con o sin un gradiente de incorporación de la alfalfa. Las principales diferencias encontradas en término de “mayor funcionalidad” fueron agrupadas en la **Tabla V.4**. Estas mismas moléculas y diferencias fueron transferidas y encontradas en leche en polvo entera y quesos.

**Tabla V.4.** Efecto de la inclusión de la pastura de alfalfa en la dieta sobre propiedades funcionales en la leche (Taverna et al, 2012)

<b>Molécula con propiedades funcionales</b>	<b>Efecto</b>	<b>Amplitud (Base = Dieta sin alfalfa)</b>
<b><i>Ácidos Grasos saludables</i></b>		
Ác. Vaccénico		10 – 300%
Ác. Linoleico conjugado (CLA)	Mayor concentración	10 – 180%
Ác. Omega 3		80 – 200%
<b><i>Vitaminas liposubles</i></b>		
Beta caroteno		100 – 400%
Alfa tocoferol	Mayor concentración	10 – 30%
Retinol		10 – 270%
<b><i>Poder antioxidante</i></b>	Mayor	20 – 70%

El alimento funcional deshidratado que se plantea en esta Tesis se denomina **Leche en Polvo alfa – BIO** y consiste en leche entera en polvo (LEP) naturalmente enriquecida en antioxidantes y ácidos grasos  $\omega_3$  desde la materia prima y adicionada de probióticos deshidratados, estable en condiciones de almacenamiento no refrigeradas. Esta última característica es lo que la diferencia de otros alimentos lácteos probióticos presentes en el mercado. Es decir, se utilizó la LEP como vehículo para adicionarle el concentrado de probióticos deshidratados.

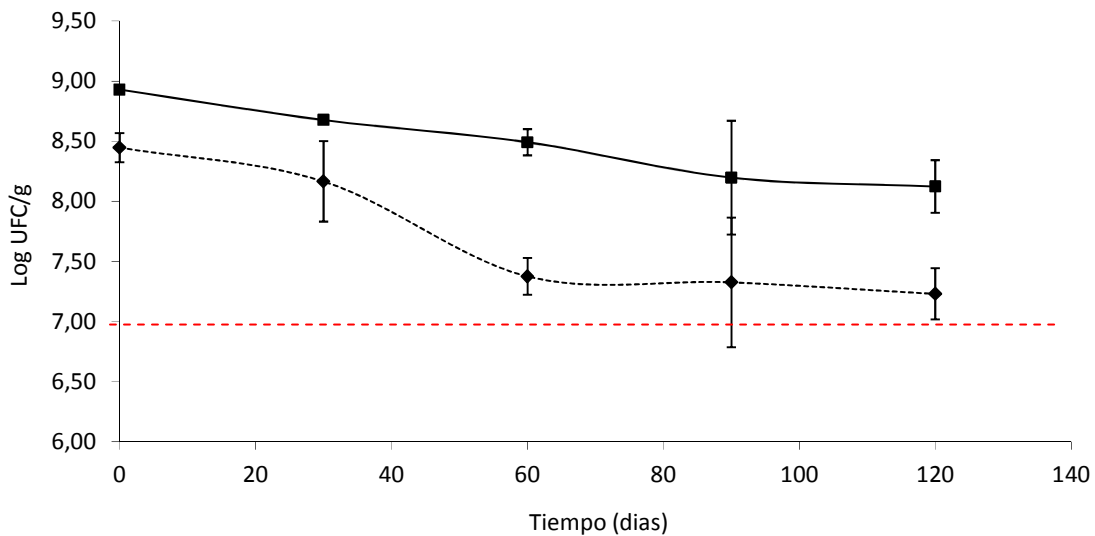
La leche entera en polvo producida a partir de leche obtenida de vacas alimentadas con una alta proporción de alfalfa (entre 35 – 70%) en su dieta, es la que de aquí en adelante llamaremos “**LEP alfa**”, caracterizada por su elevado contenido de vitaminas antioxidantes y ácidos grasos  $\omega_3$ . En la **Tabla V.5** se presenta la caracterización de la LEP alfa utilizada en el ensayo. Esta LEP contiene entre 40 y 80% más de vitaminas liposolubles antioxidantes y 3 veces más la concentración de ácidos grasos  $\omega_3$ , comparada con la LEP producida con materia prima proveniente de sistemas estabulados (Taverna et al. 2011; Páez et al., 2011).

**Tabla V.5.** Características de la leche entera en polvo “LEP alfa”

<b>“Leche entera en polvo alfa”</b>	
<b>Composición Química proximal (% p/p)</b>	
Grasa	27,50
Proteína	24,86
Lactosa	39,54
Humedad	1,86
<b>Perfil mineral (% p/p)</b>	
Ca	1,06
Mg	0,14
Na	0,61
K	1,70
P	0,67
Cl-(mg/100 g)	130,77
<b>Composición de ácidos grasos (%)</b>	
Saturados totales	65,71
Insaturados totales	31,75
Monoinsaturados	23,77
Poliinsaturados	4,65
Rel Saturados/Insaturados	2,07
Trans totales	3,34
Ácidos $\omega$ 3	1,05
Ácidos $\omega$ 6	2,75
Relación $\omega$ 3/ $\omega$ 6	0,38
<b>Contenido de vitaminas</b>	
Beta caroteno ( $\mu$ g/ml Leche fluida)	1,225
Alfa tocoferol ( $\mu$ g/ml Leche fluida)	5,798
Gama tocoferol ( $\mu$ g/ml Leche fluida)	0,237
D3 ( $\mu$ g/ml Leche fluida)	0,623
Retinol ( $\mu$ g/ml Leche fluida)	9,504
TBA (ppb)	1035
FRAP (eq. $\mu$ M Fe+2)	237

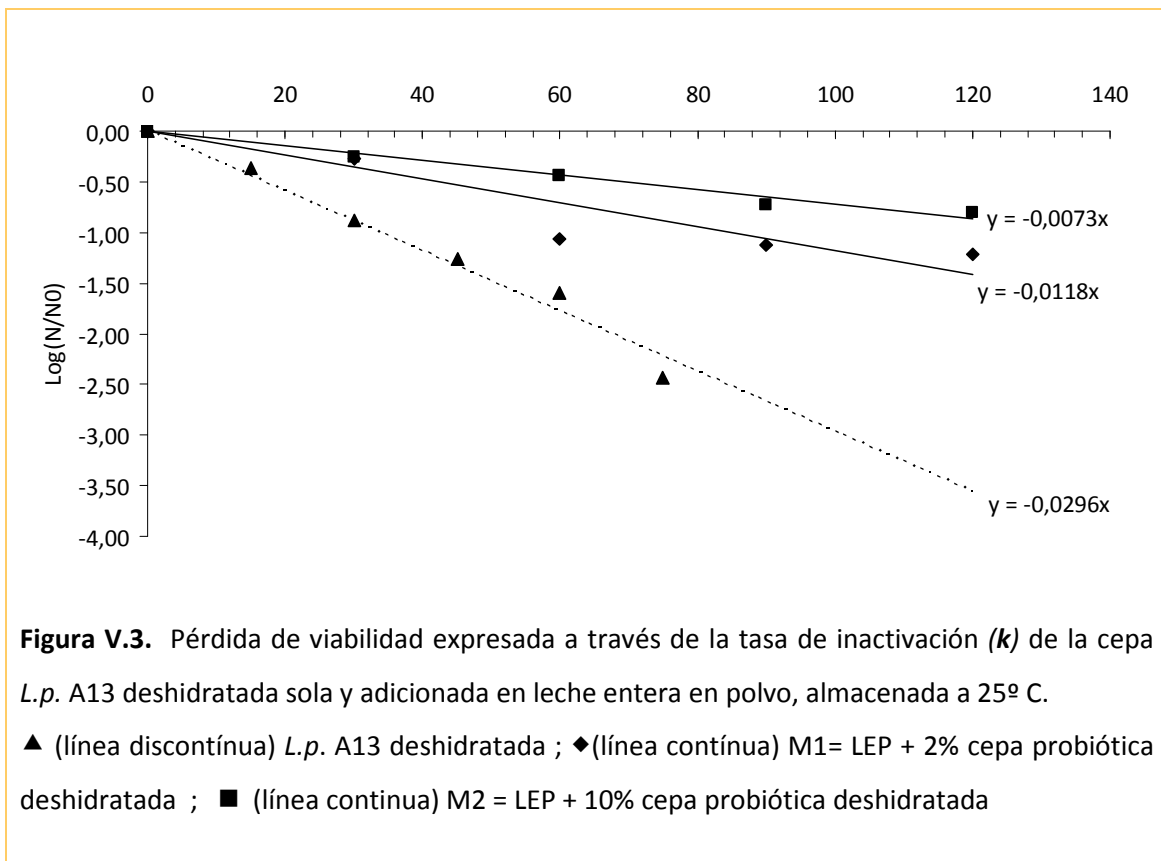
El recuento de probióticos viables del concentrado deshidratado utilizado para mezclar con la LEP fue de  $1,3 \times 10^{10}$  UFC/g y una humedad de 4,64%. La **LEP alfa-BIO** se preparó mezclandola con el probiótico deshidratado en condiciones estériles. La **Figura V.2** muestra la estabilidad de la cepa *L.p.* A13 deshidratada incorporada a la LEP durante el almacenamiento a 25° C durante 120 días.

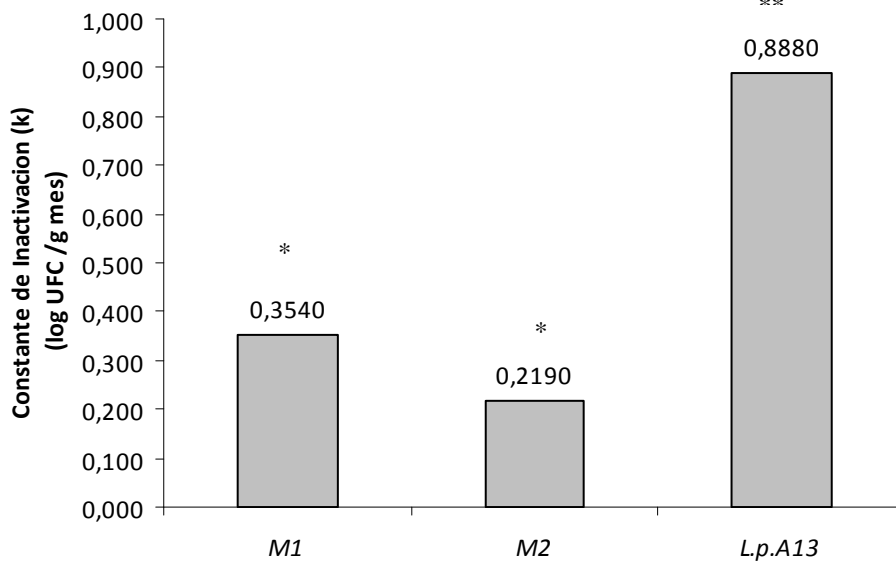
Los resultados obtenidos demuestran que la disminución en el recuento de probióticos se incrementa con el tiempo de almacenamiento. En ambas mezclas se observó pérdida de viabilidad de los probióticos después de 120 días de almacenamiento de 1,22 unidades log para M1 y 0,81 unidades log para M2, respectivamente. Después de 120 días a 25°C se mantuvo un recuento por encima de  $1 \times 10^7$  UFC/g.



**Figura V.2.** Viabilidad de *L.p.* A13 deshidratado adicionado en leche entera en polvo, almacenada a 25° C durante 120 días. ♦ (línea discontinua) M1= LEP + 2% probióticos    ■ (línea continua) M2 = LEP + 10% probióticos

En la Fig V.3 se observan las líneas de regresión a partir de las cuales se calcularon las constantes de inactivación ( $k$ ) de la cepa *L.p.* A13 deshidratada, sola y mezclada en diferentes proporciones con leche entera en polvo (M1 y M2). En la Fig V.4 se presenta la comparación de las tasas de inactivación de las mezclas tomando como referencia la de *L.p.* A13 deshidratada. Las tasas de inactivación de las mezclas M1 y M2 almacenadas a 25°C fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) menores que la de la cepa sola.





**Figura V.4.** Constantes de inactivación de las mezclas de LEP con la *L.p.* A13 (M1 y M2).

\* Significativamente diferentes de la cepa deshidratada ( $p < 0,05$ ).

Teniendo en cuenta la concentración de células viables en cada mezcla (M1 y M2) durante el período de conservación probado y además, que la LEP se reconstituye al 13% de sólidos totales para su consumo, podemos inferir que la mezcla M1 (con 2% de adición de probióticos encapsulados), solo podría conservarse un mes a temperatura ambiente, ya que después de ese período la concentración de células viables está por debajo de lo mínimo recomendado para alimentos funcionales probióticos (1 g de la mezcla M1 de la LEP alfa –bio tiene  $1,7 \times 10^8$  UFC/g de bacterias probióticas viables al mes de almacenamiento a temperatura ambiente; esto implica que tendrá  $2,2 \times 10^7$  UFC/ml una vez reconstituida al 13% ).

En la mezcla M2 (con 10% de adición) el nivel de células viables se mantuvo por encima del umbral hasta los cuatro meses de almacenamiento (1 g de la mezcla M2 de la LEP alfa –Bio tiene  $1,4 \times 10^8$  UFC/g de bacterias probióticas viables a los 4 meses de

almacenamiento a temperatura ambiente; esto implica que tendrá  $1,85 \times 10^7$  UFC/ml una vez reconstituido al 13%).

#### **V.4. Discusión**

##### **V.4.1. Suplemento dietario**

Varios factores de la matriz alimentaria influyen en la viabilidad de los probióticos, entre ellos: acidez, producción de peróxido de hidrógeno, contenido de oxígeno, concentración de azúcares, actividad acuosa ( $a_w$ ), metabolitos así como también la temperatura de almacenamiento de los mismos (Champagne et al, 2011).

La mayoría de los alimentos funcionales son productos fermentados y la acidez es el principal factor de deterioro de la viabilidad durante el almacenamiento de los mismos. Lo mismo sucede para los jugos de frutas (Champagne et al., 2008). Hay datos contradictorios en relación a la adición de probióticos en jugos ya que algunos estudios demostraron que existe variabilidad asociada a la cepa y al tipo de jugo y por el contrario, otros estudios demostraron amplia estabilidad en la viabilidad no ligada a la cepa pero si al modo de preparación del cultivo y al estado de la células inoculadas (frescas, liofilizadas), a la temperatura de almacenamiento y al tipo de fibra adicionada (Saarela et al., 2006).

En esta Tesis se planteó la adición de probióticos deshidratados en diversas matrices alimentarias con pH variable dado que no hay demasiada información publicada sobre este punto. Se evaluó la influencia de la matriz alimentaria sobre la viabilidad de cultivos deshidratados de las cepas *L.p.* A13, *L.a* A9 y *Lc* Dan incorporados en diferentes alimentos líquidos y sólidos. Las diferencias en la viabilidad en los diferentes alimentos líquidos se asociaron a la cepa ( $p < 0,05$ ). No se observaron cambios significativos en la



viabilidad celular asociado a la matriz alimentaria cuando se adicionó el suplemento probiótico en alimentos líquidos (agua, leches, jugo) evaluados inmediatamente y después de 60 minutos de la adición. La rehidratación y homogeneización de los cultivos deshidratados en el medio de recuperación previo a la adición al alimento podría explicar el mantenimiento de la viabilidad y la estabilidad de los recuentos.

Estos resultados coinciden con los publicados por Champagne & Gardner (2008), quienes observaron que algunas cepas de lactobacilos son muy estables en mezclas con jugos de frutas. También observaron que en este tipo de alimentos la variación en la estabilidad de los lactobacilos adicionados estuvo exclusivamente asociada a la cepa y a la especie.

Estos resultados también son acordes con lo presentado por Vinderola et al., (2012), quienes no encontraron diferencias en la viabilidad de cultivos liofilizados de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* INL1 incorporados en purés de frutas para bebé.

Sin embargo, en los alimentos sólidos evaluados se observó una leve tendencia a la disminución en el recuento de probióticos con el pH del alimento para las tres cepas estudiadas. Independientemente de la cepa adicionada, los menores recuentos de probióticos se dieron siempre en la gelatina (pH = 3,5).

En todos los casos los niveles alcanzados y las dosis de consumo, fueron acordes a lo que se especifica como nivel mínimo para alimentos funcionales.

#### **V.4.2. Leche en Polvo *Alfa – BIO***

En el año 2001 un grupo de expertos de la FAO reunidos en Córdoba (FAO – OMS, 2002) consideró necesario estudiar más detenidamente las propiedades saludables y nutricionales de la leche en polvo con bacterias lácticas. Este grupo de expertos convino en que no había información suficiente sobre la estabilidad de los probióticos en la leche en polvo y que se disponía en ese momento de poca información sobre diversos aspectos de la calidad de los probióticos después del secado por pulverización.

Por otro lado, la producción de probióticos deshidratados es de particular interés para la fabricación de fórmulas infantiles. Un objetivo importante de esta industria es fabricar productos que sean funcionalmente similares a la leche humana.

Mientras que la tecnología de procesamiento está disponible para la fabricación de una fórmula infantil con una composición global similar a la leche humana, se siguen perfeccionando métodos para la incorporación de otros factores (Lönnerdal, 2003).

Por ejemplo, la flora intestinal de lactantes alimentados con leche humana es diferente a la de las fórmulas para alimentar lactantes (Edwards et al., 2002). A partir de esto se han propuesto diversos métodos para incrementar la concentración de organismos probióticos en el intestino del lactante. Uno de estos métodos incluye la incorporación de los probióticos en preparaciones deshidratadas (Saavedra et al., 2004).

En los últimos años se han desarrollado fórmulas infantiles conteniendo probióticos y se realizaron ensayos clínicos que confirman el efecto benéfico y la seguridad del probiótico sobre la salud. (Chouraqui et al, 2008; Saavedra et al., 2004). En un ejemplo, la mezcla de preparaciones liofilizadas de *L. reuteri*, *L. acidophilus* y *B. bifidum* llevó al desarrollo de una fórmula infantil para prevenir la diarrea. Este tipo de formulación fue

eficaz en la prevención de la diarrea en bebés cuando el consumo de los tres organismos estuvo entre  $10^8$  a  $10^{10}$  UFC/día.

Otros antecedentes de LP o fórmulas infantiles con adición de probióticos que se lanzaron en diferentes mercados son:

- **Peques 2** con Hereditum de Puleva (España): fórmula infantil con inclusión de *Lb. fermentum*.
- **Nido 1+** de Nestlé (México): fórmula con probiótico *Lb. Protectus*
- **Neslac** de Nestlé (India): fórmula infantil que contiene *B. animalis* spp. *lactis* BB - 12 para lactantes (Playne et al., 2003; Chouraqui et al., 2004).
- **Proceliac**: desarrollada por CSIC, Biopolis y CAPSA (España): leche en polvo adicionada con *Bifidobacterium longum* ES-1.

Previo al lanzamiento de estos productos comerciales conteniendo probióticos, es indispensable realizar test de estabilidad para confirmar la viabilidad de los probióticos a fin de poder establecer la vida útil de los mismos. Por lo tanto, el valor comercial de estas fórmulas en polvo está ligado a la viabilidad de los probióticos adicionados.

Las fórmulas en polvo son almacenadas a temperatura ambiente y normalmente están sometidas a temperaturas mayores durante el transporte o el almacenamiento intermedio previo al destino final. La viabilidad de los probióticos desciende durante el almacenamiento y la velocidad de descenso aumenta con la temperatura.

De la revisión de la literatura, surge que hay pocos reportes de estabilidad de probióticos deshidratados incorporados en fórmulas infantiles en polvo (Pérez Conesa et al. 2006; Abe et al., 2009a; Abe et al., 2009 b; Makinen et al., 2012). Lo que tienen en común las fórmulas infantiles mencionadas anteriormente es que la mayoría

sugiere que una vez abierto el envase original, el contenido se debe consumir en el plazo de un mes.

En este trabajo de tesis se seleccionó la mezcla en seco como el método para preparar productos a base de leche en polvo que contengan probióticos. Se desarrollaron pruebas de almacenamiento de las mezclas evaluando la viabilidad de los probióticos como factor limitante de la vida útil del producto.

Se verificó que La LEP es un vehículo factible de ser utilizado. Partiendo de una concentración inicial en el probiótico deshidratado de  $10^{10}$  UFC/g' y adicionando al 2% a la LEP, el producto mezcla se podría conservar durante 1 mes a 25°C envasado al vacío. Adicionado al 10%, la conservación se puede extender hasta los 4 meses. Estos plazos de vida útil se calculan en base a la concentración mínima requerida por porción en un alimento funcional.

Varios autores (O'Riordan et al, 2001; Crittenden et al., 2006; Rodriguez-Huezo et al., 2007; Chávez et al, 2007; Hsiao et al, 2007; Oliveira et al, 2007a; Oliveira et al, 2007b) han publicado sus trabajos comparando el efecto de la encapsulación sobre la viabilidad del probiótico en productos deshidratados. Sin embargo, solo O'Riordan et al., (2001) y Weinbreck et al., (2010) y Ricci et al., (2011) probaron al probiótico mezclado con un alimento deshidratado, tal como bebida deshidratada, muesli, fórmula infantil y cacao en polvo. El trabajo realizado por Weinbreck et al., (2010) demostró que la fórmula infantil en polvo no tenía efecto sobre la supervivencia del probiótico deshidratado en el tiempo.

Contrariamente a este último trabajo, los resultados obtenidos en esta Tesis permiten plantear la hipótesis que la leche en polvo con alta concentración de antioxidantes naturales ejerce un efecto protector sobre la estabilidad del probiótico deshidratado,

ya que el  $D_{25}$  de la cepa *L.p.* A13 es de 34 días y en la mezcla con LEP la reducción de 1 ciclo log tarda entre 2 y 3 veces mas, llegando casi a los 120 días de vida útil.

Los resultados obtenidos en esta tesis coinciden con los presentados por Abe et al., 2009 en los que las tasas de inactivación de productos comerciales en polvo conteniendo probióticos deshidratados, fueron significativamente menores que la obtenida para la cepa deshidratada conservada en idénticas condiciones.

Este resultado podría deberse a la menor humedad y por tanto  $a_w$  de la leche en polvo utilizada comparada al valor de la cepa deshidratada. La humedad promedio de la LEP utilizada en el estudio fue de 1,5%. Varios estudios corroboran la estrecha relación entre la humedad del polvo y la estabilidad de los probióticos (Golowczyk et al, 2010). Adicionalmente, podría contribuir que los probióticos están vehiculizados en un producto deshidratado con alta concentración de antioxidantes.

En base a estos resultados es factible pensar que la LEP con adecuada humedad y alta concentración de antioxidantes representan una formula láctea simple en la cual los probióticos deshidratados se pueden incorporar, sobrevivir y mantener su funcionalidad durante el almacenamiento. Los mismos confirman la estabilidad de la *LEP Alfa – Bio* con una concentración de probióticos viables mayor a  $1 \times 10^7$  UFC/g después de 4 meses a 25°C.

Sin embargo, a fin de poder realizar la producción de LEP alfa – Bio de manera más eficiente sería indispensable producir concentrados de bacterias probióticas deshidratados con al menos  $10^{11}$  UFC/g a fin de poder adicionarlas en bajas dosis a la LEP (por ejemplo al 1-2%). Es para ello necesario trabajar para producir el concentrado de manera muy económica, optimizando todas las variables que puedan afectar la

viabilidad durante la producción, minimizando las pérdidas durante el secado spray y su conservación.

#### **V.5. Conclusiones del capítulo**

La LEP es una matriz simple para realizar formulaciones adicionando diversos compuestos bioactivos deshidratados, entre ellos probióticos.

Algunas cepas de cultivos probióticos son capaces de mantener buena viabilidad y funcionalidad después de ser deshidratados y durante su conservación, permitiendo pensar en la posibilidad concreta del desarrollo de nuevos alimentos probióticos.

Los resultados obtenidos demuestran que las cepas deshidratadas adicionadas en diferentes matrices alimentarias fueron robustas al mantener la viabilidad en alimentos líquidos y sólidos con diferentes pH.

También se demostró que es posible lograr y conservar sin refrigeración al menos por 4 (cuatro) meses una leche en polvo funcional, enriquecida naturalmente en vitamina antioxidante y ácidos grasos  $\omega 3$  y adicionada con probióticos deshidratados, asegurando que se alcanza la dosis requerida para lograr el efecto benéfico en la salud.

La mayor concentración de antioxidantes podría actuar protegiendo a los probióticos del efecto deteriorante del oxígeno durante el almacenamiento, sumado al efecto benéfico propio.

***Capítulo VI.***  
***Conclusiones Generales***

---

El mercado de alimentos funcionales, en particular aquellos que incorporan bacterias probióticas, se encuentra en constante expansión. La diversificación de este mercado genera la necesidad de disponer de cultivos comerciales de bacterias probióticas en diferentes presentaciones. Hasta ahora, los productos lácteos fermentados y no fermentados, han sido utilizados como los productos alimenticios comerciales más exitosos para suministrar bacterias probióticas. La incorporación de los mismos en los alimentos está basada casi exclusivamente en la utilización de cultivos congelados o liofilizados proporcionados por compañías extranjeras

La producción de cultivos deshidratados de probióticos es particularmente interesante porque, a diferencia de los cultivos congelados, requieren una capacidad de almacenamiento más reducida, así como de un menor costo de transporte y refrigeración. Sin embargo, el mantenimiento de la viabilidad celular durante el secado y el almacenamiento continúa siendo un desafío importante.

El secado spray es una tecnología aún no utilizada a nivel comercial en el país para la producción de cultivos probióticos de uso en alimentos, a pesar de contar con la capacidad instalada para hacerlo, lo que ofrece una oportunidad para el desarrollo de probióticos nacionales. Se presenta como una herramienta tecnológica alternativa y prometedora respecto de la liofilización, debido a su menor costo comparativo y a permitir la producción continua de grandes cantidades de células deshidratadas en breves períodos.

Sin embargo, se observó que el éxito de su aplicación está altamente relacionado a la cepa y a la optimización de las condiciones de producción. La supervivencia al secado spray y la estabilidad durante el almacenamiento son procesos complejos que resultan de la combinación de varios parámetros. La matriz alimentaria así como muchas otras



variables tecnológicas involucradas en la fabricación de cultivos probióticos, han sido señaladas como responsables de los cambios en su funcionalidad.

En esta tesis se estudió el secado spray, como alternativa tecnológica de menor costo a la liofilización, aplicado como método de conservación de bacterias probióticas, evaluando viabilidad, funcionalidad, aspectos morfológicos y tecnológicos de los concentrados de probióticos en polvo obtenidos. Se aplicó un pretratamiento térmico subletal previo al secado spray para evaluar la factibilidad de incrementar la resistencia térmica intrínseca de las cepas y mejorar la viabilidad post secado y la conservación de los probióticos deshidratados. A la vez, atendiendo a la inquietud de organismos como OMS y FAO de producir nuevos alimentos funcionales, fundamentalmente deshidratados, se planteó el desarrollo de un suplemento probiótico deshidratado para adición en diversas matrices alimentarias y de una leche entera en polvo funcional naturalmente enriquecida en antioxidantes y ácidos grasos W3 adicionada con los probióticos deshidratados.

Los resultados demostraron que existen cepas de bacterias probióticas con adecuada tolerancia al proceso de secado spray mientras que, para cepas sensibles, el pretratamiento térmico puede ser una alternativa para mejorar su viabilidad y estabilidad durante el almacenamiento.

Se verificó que un tratamiento térmico subletal fue efectivo para aumentar la supervivencia de ciertas cepas de lactobacilos (*L.c. Dan* y *L.pl. 8329*) al secado spray y al almacenamiento de los polvos obtenidos. Esta capacidad de superar el estrés del secado se mantuvo por un mínimo de 4hs entre la aplicación del calor y el secado spray.

Con las condiciones de secado aplicadas se obtuvieron polvos con valores de supervivencia razonables superiores al 50% y estabilidad durante el almacenamiento variable según la cepa utilizada. Las características tecnológicas de los polvos obtenidos, tales como la humedad y aw, aseguran una adecuada conservación de los mismos. Para todas las cepas estudiadas, la viabilidad estuvo inversamente relacionada con la temperatura de almacenamiento de los polvos. La máxima supervivencia de los probióticos deshidratados durante el almacenamiento se obtuvo a 5°C, envasados al vacío. A todas las temperaturas ensayadas, las cepas más estables fueron *L.a.* A9 y *L.pl.* 8329.

Se estudió la aplicación de diversas matrices de secado (leche descremada sola o adicionada ya sea con almidón o con concentrado de proteínas de suero). No se observaron diferencias en la viabilidad celular antes y después del secado spray con los diferentes medios de secado. Sin embargo, para todas las cepas ensayadas la mínima diferencia en la viabilidad por efecto del secado spray se obtuvo utilizando la combinación de LPD y almidón de maíz, alcanzando valores próximos a 70%. Si bien no hubo diferencias significativas entre cepas, la más robusta fue *L.p.* A13 ya que con la misma se alcanzaron los % de supervivencia más altos (entre 70 y 75%) en las tres matrices ensayadas.

El secado spray se aplicó con diferentes resultados para las cepas evaluadas en cuanto a supervivencia y conservación. Se logró producir concentrados deshidratados de probióticos pero aún resta mejorar rendimientos, aspectos técnico - funcionales y vida útil de los polvos probióticos para ser adicionados en diferentes matrices alimenticias.

Se ha comprobado que los recuentos celulares brindan información parcial sobre la funcionalidad de una cepa sometida a tratamientos tecnológicos como el secado spray. Se observó además la importancia de los estudios *in - vivo* para ratificar o rectificar los resultados *in - vitro*. Es por ello que en esta tesis se planteó la realización estudios de funcionalidad *in-vitro* e *in-vivo*.

Se demostró que el secado spray produce efectos cepa-dependientes sobre la resistencia gastrointestinal en función de la matriz de secado empleada, induciendo una mayor resistencia gastrointestinal cuando se utiliza como matriz soporte leche descremada adicionada con almidón, en relación al secado solo con leche descremada. También se verificó que el proceso de secado spray no modifica la capacidad de inducir proliferación de células IgA+ en las cepas probióticas evaluadas.

La aplicación del secado spray fue efectiva para mejorar la funcionalidad de las cepas.

La resistencia a la digestión gastrointestinal simulada y la capacidad inmunoestimulante se incrementaron con el secado spray dependiendo de la cepa.

Los resultados obtenidos demuestran que las cepas deshidratadas adicionadas en diferentes matrices alimentarias fueron robustas al mantener la viabilidad en alimentos líquidos y sólidos con diferentes pH.

La LEP es una matriz simple para realizar formulaciones adicionando diversos compuestos bioactivos deshidratados, entre ellos probióticos. A partir de esto, se demostró que es posible lograr y conservar sin refrigeración al menos por 4 (cuatro) meses una leche en polvo funcional, enriquecida naturalmente en vitamina antioxidante y ácidos grasos  $\omega 3$  y adicionada con probióticos deshidratados, asegurando que se alcanza la dosis requerida para lograr el efecto benéfico en la salud.

La mayor concentración de antioxidantes podría actuar protegiendo a los probióticos

del efecto deteriorante del oxígeno durante el almacenamiento, sumado al efecto benéfico propio.

El conjunto de resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el secado spray es una herramienta tecnológica promisoría para la conservación de cultivos probióticos en medios lácteos cuando las cepas son capaces de superar el tratamiento térmico involucrado en la deshidratación.

Las cepas microencapsuladas en leche descremada enriquecida con otros ingredientes tales como almidón o concentrado de proteínas de suero por secado spray demostraron un buen potencial para su uso como aditivo alimentario o para su incorporación en alimentos funcionales, dando a la vez un paso importante hacia la aplicación de tecnologías instaladas en el país tendientes al desarrollo de cultivos probióticos nacionales.

Este es el primer informe que presenta el efecto del secado spray en la capacidad inmunoestimulante de las bacterias probióticas *in vivo*.

El escalado del secado de cepas probióticas es aún necesario para verificar si los altos rendimientos de células viables con propiedades mejoradas *in vitro* e *in vivo* se mantienen a nivel industrial.

# ***Bibliografía.***

---

- Abadias M, A Benabarre, N Teixidó, J Usall, I Viñas Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, 65 (3), 173–182
- Abadias M., Teixido N., Usall J., Benabarre A. & Vinas, I. (2001b). Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. *Journal of Food Protection*, 64, 856-861.
- Abe, F., Miyauchi, H., Uchijima, A., Yaeshima, T. and Iwatsuki, K. (2009), Stability of bifidobacteria in powdered formula. *International Journal of Food Science & Technology*, 44: 718–724.
- Abe, F., Miyauchi, H., Uchijima, A., Yaeshima, T. and Iwatsuki, K. (2009), Effects of storage temperature and water activity on the survival of bifidobacteria in powder form. *International Journal of Dairy Technology* 62, 2, 234 – 239.
- Adhikari, K., Mustapha, A., & Grun, I. U. (2003) . Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt. *Journal of Food Science*, 68(1), 275-280.
- Ananta, E., Volkert, M. and Knorr, D., (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal* 15, 399-409.
- Arihara K., Ota H., Itoh M., Kondo Y., Sameshima T., Yamanaka H., et al. (1998). *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. *Journal of Food Science*, 63, 544–547.

- Augustin M.A., Luz Sanguansri, Christine M. Oliver (2010) Functional properties of milk constituents: Application for microencapsulation of oils in spray-dried emulsions — A minireview *Dairy Science & Technology* 90 (2-3), 137-146.
- Barbosa-Canovas, G.V.; Ortega-Rivas, E.; Juliano, P.; Yan, H. *Food Powders: Physical Properties, Processing and Functionality*; Kluwer Academic: New York, 2005.
- Bayrock D. & Ingledew W. M. (1997a). Fluidized bed drying of baker's yeast: moisture levels, drying rates, and viability changes during drying. *Food Research International*, 30, 407–415.
- Bielecka M. & Majkowska A. (2000). Effect of spray drying temperature of yoghurt on the survival of starter cultures, moisture content and sensoric properties of yoghurt powder. *Food* 44, 257-260.
- Boza Y., Barbin D., & Scamparini A. R. P. (2004). Effect of spray-drying on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia spp.* *Process Biochemistry*, 39, 1275–1284.
- Buchi B 290 – Manual del usuario
- Buitink J., Van den Dries I. J., Hoekstra F. A., Alberda M. & Hemminga M. A. (2000). High critical temperature above T<sub>g</sub> may contribute to the stability of biological systems. *Biophysical Journal*, 79, 1119-1128.
- Burgain J., Gaiani C., Linder M. & Scher J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104, 467-483.
- Burns P, Molinari F, Beccaria A, Páez R, Meinardi C, Reinheimer J and Vinderola G (2010) Suitability of buttermilk for fermentation with *Lactobacillus helveticus* and production of a functional peptide-enriched powder by spray-drying. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1370-1378.

- Cal K. & Sollohub K. (2010). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 99 587.
- Carvalho A S, Silva J, Ho P, Teixeira P, Gibbs P and Malcata F X (2002) Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnology Letters* 24 1587–1591.
- Carvalho A.Sofia, Joana Silva, Peter Ho, Paula Teixeira, F.Xavier Malcata, Paul Gibbs (2003a) Impedimetric method for estimating the residual activity of freeze - dried *Lactobacillus delbrueckii spp. Bulgaricus* *International Dairy Journal*, 13 (6), 463–468
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P. (2003b). Effects of addition of sucrose and salt, and of starvation upon thermotolerance and survival during storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*. *Journal of Food Science* 68, 2538–2541.
- Carvalho A S, Silva J, Ho P, Teixeira P, Gibbs P and Malcata F X (2003c) Effects of various growth media upon survival during storage of freeze dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology* 94, 947–952.
- Carvalho A. S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F. X. & Gibbs P. (2003d). Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Le Lait*, 83, 203 - 210
- Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata, F.X. & Gibbs P. (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 14, 835-847.
- Castro H.P., Teixeira P. M. & Kirby R. (1995). Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 172.



- Castro H.P., Teixeira P. M. & Kirby R. (1996). Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnology Letters*, 18, 99.
- Cerrutti P., de Huerdo M. S., Galvagno M., Schebor C., & del Pilar Buera M. (2000). Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 575–580.
- Champagne C. P., Gardner N. J. & Roy D. (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, 61-84.
- Champagne C. P. & Fustier P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 1–7.
- Champagne, C.P., Raymond, Y. and Gagnon, R. (2008), Viability of *Lactobacillus Rhamnosus* R0011 in an Apple-Based Fruit Juice under Simulated Storage Conditions at the Consumer Level. *Journal of Food Science*, 73: M221–M226.
- Champagne C.P. & Kailasapathy K. (2008). Chapter 14: Encapsulation of probiotics. In: Garti, N. (Ed.), *Controlled Release Technologies for Targeted Nutrition*. Woodhead Publishing, CRC Press, London, pp. 344 - 369.
- Champagne Claude, R. Paul Ross, Maria Saarela, Ken Flemming Hansen, Dimitris Charalampopoulos (2011) Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology* 149 (3), 185–193
- Chávez B. E. & Ledebøer A. M. (2007). Drying of Probiotics: Optimization of Formulation and Process to Enhance Storage Survival. *Drying Technology* 25(7-8): 1193-1201.

- Chiang S. S. and Pan T. M. (2012) Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93 (3):903-916. Epub 2011 Dec 9.
- Christiansen P., E. Waagner Nielsen, Finn K. Vogensen, Carl-Henrik Brogren, Ylva Ardö  
Heat resistance of *Lactobacillus paracasei* isolated from semi-hard cheese made of pasteurised milk. *International Dairy Journal*, 16 (10), 1196–1204.
- Chouraqui, J.-P., van Egroo, L.D. &Ficot, M.C. (2004) Acidified milk formula supplemented with *Bifidobacterium lactis*: impact on infant diarrhea in intestinal care settings. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 38, 288–292.
- Corcoran B. M., Ross R. P., Fitzgerald G. F. & Stanton C., (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5): 1024 -1039.
- Corcoran B.M., Stanton C., Fitzgerald G. & Ross R.P. (2008). Life under stress: The probiotic stress response and how it may be manipulated. *Current Pharmaceutical Design*, 14, 1382-1399.
- Costa E., Usall J., Teixido N., Garcia N. & Vinas I. (2000). Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology* 89, 793-800.
- Crittenden, R., Weerakkody, R., Sanguansri, L., & Augustin, M. (2006). Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated

- storage and gastrointestinal transit. *Applied and Environmental Microbiology* 72(3), 2280 -2282.
- Crowe J. H., Crowe L. M., Carpenter J. F. & Wistrom C. A. (1987). Stabilization of dry phospholipid-bilayers and proteins by sugars. *Biochemistry Journal* 242, 1-10.
- De Angelis M., Raffaella Di Cagno, Claude Huet, Carmine Crecchio, Patrick F. Fox, Marco Gobbetti Heat Shock Response in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol.* 2004 March; 70(3): 1336–1346
- De Vos P., Faas M. M., Spasojevic M. & Sikkema J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4): 292-302.
- de Vrese M. & Schrezenmeir J. (2008). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. In Food Biotechnologyvol 111, 1-66. Edited by; *Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology*,
- Del Piano M., Morelli L., Strozzi G. P., Allesina S., Barba M., Deidda F., Lorenzini P., Ballar M., Montino F., Orsello M., Sartori M., Garello E., Carmagnola S., Pagliarulo M. & Capurso L. (2006). Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease* 38(2), S248–255.
- Desai K. G. H. & Park H. J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology* 23, 1361–1394.
- Descalzo, A; Rosetti L; Paez R; Grigioni G; Negri L.; Costabel L.; Garcia P.; Salado E.; Antonacci L.; Bretschneider G; Comeron E; Gagliostro G and Taverna M. (2012) “Differential characteristics of milk produced in grazing systems and their impact on dairy products” in “Milk Production – Advanced genetic trait, cellular mechanism, animal management and health” Book 2 Cap 15 pp. 339 – 368.

- Desmond C., Stanton C., Fitzgerald G. F., Collins K. & Ross R. P. (2001). Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal*, 11(10): 801-808.
- Desmond C, Stanton C, Fitzgerald G F, Collins K and Ross R P (2002a) Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal* 12, 183-190.
- Desmond C., Ross R. P., O'Callaghan E., Fitzgerald G. & Stanton C. (2002b). Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology*, 93(6), 1003-1011.
- Desmond C., Fitzgerald G. F., et al. (2004). Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10): 5929-5936.
- Dimitrellou D., Tsaousi K., Kourkoutas Y., Panas P., Kanellaki M. & Koutinas A. A. (2008). Fermentation efficiency of thermally dried immobilized kefir on casein as starter culture. *Process Biochemistry*, 43, 1323–1329.
- Edwards, C.A., Parrett, A.M., Stephen, A.M., Henry, C. J. Marks, J. & Shortt, C. (2002) Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88 (Suppl. 1), S11–S18.
- Elizondo H. & Labuza T. P. (1974). Death kinetics of yeast in spray drying. *Biotechnology and Bioengineering*, 16, 1245–1259.
- Espina F. and Packard V. S. (1979). Survival of *Lactobacillus acidophilus* in a spray – drying process. *Journal of Food Protection* 42, 149-152.

- FAO/WHO (2001). Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. <http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm>
- FAO/WHO (2002). Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada. April 30 and May 1, 2002.
- Favaro-Trindade C. S. & 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. *Journal of Microencapsulation*, 19(4), 485-494.
- Ferreira V., Soares V., Santos C., Silva J., Gibbs P. A. & Teixeira P. (2005). Survival of *Lactobacillus sakei* during heating, drying and storage in the dried state when growth has occurred in the presence of sucrose or monosodium glutamate. *Biotechnology Letters*, 27, 249–252.
- FIL - IDF (1993) Dried Milk and Dried Cream. Determination of Water Content. International Dairy Federation Standard 26A. Brussels, Belgium: International Dairy Federation
- P. Foerst, U. Kulozik, M. Schmitt, S. Bauer, C. Santivarangkna (2012) Storage stability of vacuum-dried probiotic bacterium *Lactobacillus paracasei* F19. *Food and Bioproducts Processing* 90 (2), 295–300.
- Fonseca F., Catherine Béal and Georges Corrieu (2000). Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research* 67, 83-90.
- Fooks, L. J., & Gibson, G. R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition* 88, S39-S49.

- Fritzen-Freire C B, Prudêncio E, Amboni R, Pinto S, Negrão-Murakami A N and Murakami F S (2012) Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International* 45, 1, 306-312.
- Fu N. & Chen X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, 44, 1127–1149.
- Fu W. Y. & Etzel M. R. (1995). Spray drying of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* C2 and cellular injury. *Journal of Food Science*, 60, 195–200.
- Gardiner G. E., O'Sullivan E., Kelly J., Auty M. A. E., Fitzgerald G. F., Collins J. K., Ross R. P. & Stanton C. (2000). Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2605-12.
- Gardiner G, Bouchier P, O'Sullivan E, Kelly J, Collins K, Fitzgerald G, Ross R P and Stanton C (2002) A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. *International Dairy Journal* 12, 749–756.
- German B., Schiffrin E. J., Reniero R, Mollet B., Pfeifer A. & Neeser J-R. (1999). The development of functional foods: lessons from the gut. *Tibtech* (17) 492- 499.
- Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A. & Saurel R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 1107–1121.
- Gibbs B. F., Kermasha S., Alli I. & Mulligan C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50, 213–224.

- Golowczyc M, Silva J, Abraham A, De Antoni G, Teixeira P (2010) Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray-drying. *Letter Applied Microbiology* 50:7-12.
- Golowczyc Marina, Joana Silva, Paula Teixeira, Graciela L. De Antoni, Analía G. Abraham (2011) Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. *International Journal of Food Microbiology* 144 (3), 556–560.
- Gouin S. (2004). Micro-encapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 330–347.
- Hernandez A., Weekers F., Mena J., Pimentel E., Zamora J., Borroto C., et al. (2007). Culture and spray-drying of *Tsukamurella paurometabola* C-924: Stability of formulated powders. *Biotechnology Letters*, 29, 1723–1728.
- Heidebach T., P. Forst, and U. Kulozik. (2009a) Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 23 (7), 1670–1677
- Holm F. (2003). Gut health and diet: The benefits of probiotic and prebiotics on human health. *The World of Ingredients*, 2, 52–55.
- Holscher H D, Czerkies L A, Cekola P, Litov R, Benbow M, Santema S, Alexander D D, Perez V, Sun S, Saavedra J M and Tappenden K A (2012) *Bifidobacterium lactis* Bb12 enhances intestinal antibody response in formula-fed infants: a randomized, double-blind, controlled trial. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 36 (1 Suppl):106S -117S

- Holzapfel W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. & Huisin't Veld J. H. J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 85–101.
- Horaczek A. & Viernstein H. (2004). *Beauveria brongniartii* subjected to spray drying in a composite carrier matrix system. *Journal of Microencapsulation*, 21, 317–330.
- Hsiao, H. C., Lian, W. C., & Chou, C. C. (2004). Effect of packaging conditions and temperature on viability of microencapsulated bifidobacteria during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(2), 134-139.
- Hubalek Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46, 205-229.
- Huys G., Vancanneyt M., D'Haene K., Vankerckhoven V., Goossens H. and Swings J. (2006). Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Research in Microbiology*, 157, 803-810.
- Ishibashi N. and Shimamura S. (1993). Bifidobacteria: Research and Development in Japan. *Food Technology* 47, 129-134.
- Jagannath A., P.S. Raju, A.S. Bawa (2010) Comparative evaluation of bacterial cellulose (*nata*) as a cryoprotectant and carrier support during the freeze drying process of probiotic lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology* 43, (8), 1197–1203
- Johnson J. A. C. & Etzel M. R. (1995). Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 attenuated by spray drying, freeze drying, or freezing. *Journal of Dairy Science*, 78, 761 - 768.



- Johnson J.A.C. & Etzel M.R. (1993). Inactivation of lactic acid bacteria during spray drying. In: Barbosa-Cánovas, G.V. and Okos, M.R. (ed.) Food Dehydration. American Institute of Chemical Engineers, New York, USA, pp. 98-107.
- Kabeerdoss J, Devi R S, Mary R R, Prabhavathi D, Vidya R, Mechenro J, Mahendri N V, Pugazhendhi S and 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 Journal* 23; 10:138.
- Kailasapathy K. & Chin J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology and Cell Biology* 78, 80–88.
- Kailasapathy K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in intestinal Microbiology*, 3(2), 39–48.
- Kearney N., Meng X.C., et al. (2009). "Development of a spray dried probiotic yoghurt containing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338." *International Dairy Journal*, 19(11): 684-689.
- Khalil A. H. & Mansour E. H. (1998). Alginate encapsulated bifidobacteria survival in mayonnaise. *Journal of Food Science*, 63, 702–705.
- Knorr, D. (1998) Technological aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends Food Science Technology* 9, 295 – 306.
- Kets, E. P. W., P. J. M. Teunissen, and J. A. M. de Bont. 1996. Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. *Applied Environmental Microbiology* 62:259-261

- Kim S. S. & Bhowmik S. R.(1990). Survival of lactic acid bacteria during spray drying of plain yogurt. *Journal of Food Science* 55, 1008-1010.
- King A. H. (1995). Encapsulation of food ingredients: A review of available technology, focusing on hydrocolloids. In S. J. Risch & G. A. Reineccius (Eds.), *Encapsulation and controlled release of food Ingredients*. ACS symposium series 590, pp. 26–39. Washington, DC: American Chemical Society.
- Kurtmann L., Leif H. Skibsted, and Charlotte U. Carlsen. Browning of Freeze-Dried Probiotic Bacteria Cultures in Relation to Loss of Viability during Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009 57 (15), 6736-6741
- Lacroix C. & Yidirim S. (2007). Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 176-183.
- Lammers K. M., Brigidi P., Vitali B., Gionchetti P., Rizzello F., Caramelli E., Matteuzzi D.& Campieri M.(2003). Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 38, 165-172.
- Langrish T A G and Fletcher D F (2001) Spray drying of food ingredients and applications of CFD in spray drying. *Chemical Engineering and Processing* 40, 345–354.
- Lian W.-C., Hsiao H.-C., et al. (2002). Survival of bifidobacteria after spray-drying. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 79-86.
- Linders L. J. M., de Jong G. I. W., Meerdink G. & van't Riet K. (1997). Carbohydrates and the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*: The role of moisture distribution and water activity. *Journal of Food Engineering*, 31, 237–250.

- Livney, Y. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15(1-2), 73–83.
- Lonnerdal, B. (2003) Breast milk and breast fed infants: implications for improving infant formula. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1537S–1543S.
- Lou Y and Yousef A E (1996) Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stress. *Journal of Food Protection* 59, 465–471.
- Macpherson A J, Hunziker L, McCoy K and Lamarre A (2001) IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes and Infection* 3, 1021–1035.
- Markowitz J. E. and Bengmark S. (2002). Probiotics in health and disease in the pediatric patient. *Journal Pediatric Gastroenterology Nutrition* 49, 127-141.
- Mauriello G., Aponte M., Andolfi R., Moschetti G. & Villani F. (1999). Spray-drying of bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 62, 773-777.
- Masco L., Huys G., De Brandt E., Temmerman R. & Swings J. (2005). Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 221-230.
- Masters K. (1985). Evaporation, Membrane Filtration and Spray-drying in Milk Powder and Cheese Production Hansen R, eds. Vanlose: North European Dairy Journal, 393.
- Matto J, Alakomi H L, Vaari A, Virkajarvi I and Saarela M. (2006) Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis spp. lactis* functionality with a special

- focus on acid tolerance and factors affecting it. *International Dairy Journal* 16, 1029-1037.
- Meng X. C., Stanton C., Fitzgerald G.F., Daly C. & Rosset R. P. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, 106(4), 1406-1416.
- Metchnikoff E. (1907) *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*. Ed. Mitchell C. Londres: William Heinemann. 161 - 183.
- Mille Y., Girard J. -P., Beney L. & Gervais P. (2005). Air drying optimization of *Saccharomyces cerevisiae* through its water-glycerol dehydration properties. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 376–382.
- Ming L.C., Rahim R.A., Wan H.Y. & Ariff A.B. (2009). Formulation of Protective Agents for Improvement of *Lactobacillus salivarius* I 24 Survival Rate Subjected to Freeze Drying for Production of Live Cells in Powderized Form. *Food and Bioprocess Technology*, 2 (4), 431 – 436
- Monteoliva-Sánchez, M., Aguilera, M., Jiménez Pranteda, M. L., & Ramos-Cormenana, A. Probióticos en las distintas etapas de la vida. In A. R. Cormenzana, M. M. Sánchez & M. E. N. Macías (Eds.), *Probióticos y Salud*. Madrid, España: Díaz de Santos.
- Mortazavian A., Razavi S. H., Ehsani M. R. & Sohrabvandi S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5, 1-18.
- Muller J. A., Stanton C., Sybesma W., Fitzgerald G. F. & Ross R. P. (2010). Reconstitution conditions for dried probiotic powders represent a critical step in determining cell viability. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1369–1379.

- Nagawa M., Nakabayashi A. & Fujino S. (1988). Preparation of the bifidus milk powder. *Journal of Dairy Science*, 71, 1777-1782.
- O'Brien J., Crittenden R., Ouwerhand A. C. & Salminen S. (1999). Safety evaluation of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 418–424.
- O'Driscoll B, Gahan C G M and Hill C (1996) Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: Isolation of an acidtolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1693–1698.
- Oliveira A. C., Moretti T. S., Boschini C., Baliero J. C. C., Freitas L. A. P., Freitas O., et al. (2007a). Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying. *Drying Technology*, 25, 1687–1693.
- Oliveira, A. C., Moretti, T. S., Boschini, C., Baliero, J. C. C., Freitas, O., & Favaro Trindade, C. S. (2007b). Stability of microencapsulated *Bifidobacterium lactis* (BI 01) and *Lactobacillus acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 24, 685-693.
- Ong L., Henriksson A., & 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. *International Dairy Journal*, 16, 446–456.
- O'Riordan K., Andrews D., Buckle K. and Conway P. (2001). Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1059–1066.

- Páez R., Negri L., Descalzo A., Taverna M., Cuatrín A., Costabel, L., Rossetti L., Grigioni G., Langman L., Castillo, A. (2011) 2 - Efecto de la inclusión de alfalfa en la dieta sobre la calidad de leche entera en polvo. 34º Congreso Argentino de producción Animal. - – 1<sup>st</sup> Join Meeting AAPA – ASAS- Mar del Plata, 4 al 8 de octubre de 2011
- Paéz R, Lavari L, Vinderola G, Audero G, Cuatrin A, Zaritzky N and Reinheimer J (2012) Effect of heat-treatment and spray drying on *lactobacilli* viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International* 48, 748-754.
- Paul E., Fages J., Blanc P., Goma G. and Pareilleux A. (1993). Survival of alginate-entrapped cells of *Azospirillum lipoferum* during dehydration and storage in relation to water properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, 34-39.
- Peighambardoust SH, Tafti AG and Hesari J (2011) Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science and Technology* 22, 215-224.
- Perdigón G, Maldonado Galdeano C, Valdez J C and Medici M (2002) Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *European Journal of Clinical Nutrition* 56, S21–S26.
- Pérez-Conesa, D., López, G. and Rosau, G. (2005), Fermentation Capabilities of Bifidobacteria Using Nondigestible Oligosaccharides, and Their Viability as Probiotics in Commercial Powder Infant Formula. *Journal of Food Science*, 70: m279–m285.

- Perry H.R., Greene D.W. & Maloney J. O. (1985). Eds. Perry's Chemical Handbook, 6th ed. MacGraw Hill Book Company, New York, USA .
- Picot A. & Lacroix C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Dairy Journal*, 14, 505-515.
- Playne, M.J., Bennet, L.E. & Smithers, G.W. (2003) Functional dairy foods and ingredients. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 242–264.
- Poirier I., Maréchal P. A., Richard S. & Gervais P. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* viability is strongly dependant on rehydration kinetics and the temperature of dried cells. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 87-92.
- Prasad J., McJarrow P. & Gopal P. (2003) Heat and Osmotic Stress Responses of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in Relation to Viability after Drying. *Applied Environmental and Microbiology* 69 (2), 917–925.
- Ramos-Cormenzana, A., Fuentes, S., Ferrer-Cebrian, R., & Monteoliva-Sanchez, M. (2005). Probiotics and biotherapy. *Recent Research Developments in Microbiology* 9 (1), 97-127.
- Ranadheera R. D. C. S., Baines S. K. & Adams M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International* 43, 1–7.
- Reddy K. B. P. K., Awasthi S. P., Madhu A. N. & Prapulla S. G. (2009). Comparative studies and evaluation of functional properties of spray-dried lactic acid bacteria. *International Journal of Dairy Technology* 62 240–248.
- Ricci G., F. Borgo, C. Ferrario and M. Fortina (2011) Cocoa Powder as Delivery Medium for Probiotic *Lactobacillus* Strains. *Advances in Microbiology*, Vol. 1 No. 1, 2011, pp. 1 - 6.

- Riveros B., Ferrer J. & Borquez R. (2009) Spray Drying of a Vaginal Probiotic Strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Drying Technology* 27, 123-132.
- Rodriguez-Huezo M E, Duran-Lugo R, Prado-Barragan L A, Cruz-Sosa F, Lobato-Calleros C, Alvarez-Ramirez J and Vernon-Carter E J (2007) Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. *Food Research International* 40 1299–1306.
- Rokka, S. & Rantamäki P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, 231 (1), 1-12.
- Ross R. P., Desmond C., et al. (2005). Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1410-1417.
- Saarela M, Virkajarvi I, Alakomi H L, Mattila-Sandholm T, Vaari A, Suomalainen T and Matto J (2005) Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1330-1339.
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H. L., Sigvart-Mattila, P. and Mättö, J., 2006 Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal* 16, 1477-1482.
- Saarela M H, Alakomi H L, Puhakka A and Mättö 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. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1204-1212.
- Saavedra, J.M., Abi-Hanna, A., Moore, N. & Yolken, R.H. (2004) Long term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *American Journal of Clinical Nutrition* 79, 261–267.
- Salminen S., von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., de Vos W. M., Fond\_ en R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S. E. & Mattila-Sandholm T. (1998). Demonstration of safety of probiotics—a review International. *Journal of Food Microbiology*, 44, 93–106.
- Salminen S., Ouwehand A., Benno Y. & Lee Y. K. (1999) Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science and Technology* 10, 107-110.
- Sanders, M. E. 1998. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 8: Issues 5 – 6 , 341-347
- Santivarangkna C., Kulozik U. & Foerst P. (2007) Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology Progress* 23, 302-315.
- Santivarangkna C., Kulozik U. & Foerst P. (2008). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology* 105, 113.
- Saulnier D. M. A., Spinler J. K., Gibson G.R. & Versalovic J. (2009). Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 135–141.
- Sawitzki, Maristela Cortez; Fiorentini, Ângela Maria; Bertol, Teresinha Marisa y Santanna, Ernani Sebastião (2009). *Lactobacillus plantarum* strains isolated

- from naturally fermented sausages and their technological properties for application as starter cultures. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 29 (2), 340-345.
- Selmer-Olsen E., Sorhaug T., Birkeland S. E., Pehrson R., (1999). Survival of *Lactobacillus helveticus* entrapped in Ca-alginate in relation to water content, storage and rehydration. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 23, 79e8
- Semyonov D, Ramon O and Shimoni E (2011) Using ultrasonic vacuum spray dryer to produce highly viable dry probiotics. *LWT - Food Science and Technology* 44, 1844 – 1852.
- Shah N.P. (2000). Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival. Dairy Foods *Journal of Dairy Science*, 83(4), 894–907.
- Shah N. P. (2004). Probiotics and prebiotics. *Agro-Food Industry Hi-tech*, 15, 13–16.
- Shahidi F. & Han X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 33, 501–547.
- Sheehan V. M., Sleator R. D., Fitzgerald G. F. & Hill C. (2006). Heterologous expression of BetL, a betaine uptake system, enhances the stress tolerance of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2170-2177.
- Sheu, T. Y. & Marshall, R. T. (1993). Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. *Journal of Food Science* 58 (3), 557-561.
- Silva J., Carvalho A.S., Teixeira P. & Gibbs P. A. (2002). Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 77–81.
- Silva J., Carvalho A. S., Pereira H., Teixeira P. & Gibbs P. A. (2004). Induction of stress tolerance in *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* by the addition of sucrose to the growth medium. *Journal of Dairy Research*, 71, 121-125.

- Silva J., Carvalho A. S., Ferreira R., Vitorino R., Amado F., Domingues P., Teixeira P. & Gibbs P. A. (2005). Effect of the pH of growth on the survival of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* to stress conditions during spray-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 775–782.
- Silva, J., Freixo, R., Gibbs, P. And Teixeira, P. (2011). Spray-drying for the production of dried cultures. *International Journal of Dairy Technology*, 64: 321–335.
- Simpson P. J., Stanton C., et al. (2005). Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 493-501.
- Sloan, E. (2006). Top 10 functional food trends. *Food Technology* **60**: 22–40.
- Soukoulis Christos, Solmaz Behboudi-Jobbehdar, Lina Yonekura, Christopher Parmenter & Ian Fisk (2013) Impact of Milk Protein Type on the Viability and Storage Stability of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 Using Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology*.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11947-11013-11120-x>
- Solmaz Behboudi-Jobbehdar, Christos Soukoulis , Lina Yonekura & Ian Fisk (2013) Optimization of SprayDrying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. *Drying Technology* 31:11, 1274-1283.
- Souza T C, Zacarías M F, Silva A M, Binetti A, Reinheimer J, Nicoli J R and Vinderola G (2012) Cell viability and immunostimulating and protective capacities of *Bifidobacterium longum* 5(1A) are differentially affected by technological variables in fermented milks. *Journal of Applied Microbiology* 112, 1184 - 1192.

- Stanton C., Gardiner G., Lynch P. B., Collins J.K., Fitzgerald G. & Ross R.P. (1998). Probiotic Cheese. *International Dairy Journal*, 8, 491-496.
- Stanton C., Gardiner G., Meehan H., Collins K., Fitzgerald G., Lynch P. B. & Ross R. P. (2001). Market potential for probiotics. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(2 Suppl): 476-483.
- Strasser S., Neureiter M., Geppl M., Braun R. & Danner H. (2009). Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 167–177.
- Sunny-Roberts E. O. & Knorr D. (2009). The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. *International Dairy Journal* 19, 209–214.
- Tabanelli G, Burns P, Patrignani F, Gardini F, Lanciottia R, Reinheimer J and Vinderola G (2012) Effect of a non-lethal High Pressure Homogenization treatment on the *in vivo* response of probiotic lactobacilli. *Food Microbiology* 32 (2), 302 – 307.
- Talwalkar A. & Kailasapathy K. (2004a). The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 5 (1), 1–8.
- Taverna, M., Páez, R., Descalzo, A., Negri, L., Costabel, L., Rossetti, L., García, P., Cuatrín, A., Castillo, A.R. (2011). 1 - Efecto de la inclusión de alfalfa en la dieta sobre la calidad de la leche. 34º Congreso Argentino de producción Animal. 1st Join Meeting AAPA – ASAS . Mar del Plata.
- Taverna, M., Páez R., Cuatrín A, Costabel L, Campos S., Lingua M. (2011) Efecto de la incorporación de alfalfa en la dieta sobre la composición de ácidos grasos en

leche y productos lácteos en dos épocas del año”. Trabajo completo. FEPALE 2010 Porto Alegre.

Taverna, M.; Costabel, L.; Páez, R.; Descalzo, A.; Rossetti, L.; Negri, L.; Cuatrín, A.; Langman, L.; Audero, G.; Velez, A.; Perotti, C.; Hynes, E.; Castillo, A. (2012). Efecto de la inclusión de alfalfa en la dieta sobre la calidad de la leche cruda, en polvo y queso Reggianito. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas a la Industria (Clicap).

Teixeira P, Castro H and Kirby R (1994) Inducible thermotolerance in *Lactobacillus bulgaricus*. *Letters in Applied Microbiology* 83 218–221.

Teixeira P. C., Castro M. H., Malcata F. X. & Kirby R. M. (1995a). Survival of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Bulgaricus* following Spray-Drying. *Journal of Dairy Science*, 78, 1025-1031.

Teixeira, P. C., Castro, M. H. and Kirby, R. M. (1995b). Death kinetics of *Lactobacillus bulgaricus* in spray drying process. *Journal of Food Protection* 58, 934-936.

Teixeira P, Castro H and Kirby R (1995c). Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Applied Bacteriology* 78 456–462.

Teixeira P., Castro H. & Kirby R. (1996). Evidence of membrane lipid oxidation of spray dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Letters in Applied Microbiology* 22, 34-38.

Teixeira P, Castro H, Moha'csi-Farkas C and Kirby R (1997) Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *Journal of Applied Microbiology* 83 219–226.

- To B. C. S. & Etzel M. R. (1997). Survival of *Brevibacterium linens* (ATCC 9174) after spray drying, freeze drying, or freezing. *Journal of Food Science* 62, 167-170.
- Tsaousi K., Dimitrellou D., & Koutinas A. A. (2008). Low-temperature thermal drying of *Saccharomyces cerevisiae* starter culture for food production. *Food Chemistry*, 110, 547–553.
- Vasiljevic T. & Shah N. P. (2008). Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), 714-728.
- Vega C. & Roos Y. H. (2006). Invited review: Spray-dried dairy and dairy-like – emulsions compositional considerations. *Journal of Dairy Science* 89, 383-401.
- Vinderola C.G., Prosello W., Ghiberto D. & Reinheimer J.A. (2000a). Viability of probiotic- (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinian Fresco Cheese. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 1905 - 1911.
- Vinderola C.G., Bailo N. & Reinheimer J.A. (2000b). Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33, 97 - 102.
- Vinderola C.G. & Reinheimer J.A. (2000). Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, *bifidobacteria* and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 10(4), 271 – 275.
- Vinderola G, Duarte J, Thangavel D, Perdigón G, Farnworth E and Matar C (2005) Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research* 72, 195-202.
- Vinderola G, Matar C and Perdigón G (2007) Milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 and its non-bacterial fraction confer enhanced protection against

- Salmonella enteritidis* serovar Typhimurium infection in mice. *Immunobiology* 212, 107-118.
- Vinderola G., W. Prosello, F. Molinari, D. Ghiberto, J. Reinheimer (2009) Growth of *Lactobacillus paracasei* A13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product. *International Journal of Food Microbiology*, 135, (2), 171–174.
- Vinderola G., Binetti A., Burns P. & Reinheimer J. (2011a). Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 2, 70.
- Vinderola G, Céspedes M, Mateolli D, Cárdenas P, Lescano M, Aimaretti N and Reinheimer J (2011b) Changes in gastric resistance of *Lactobacillus casei* in flavoured commercial fermented milks during cold storage. *International Journal of Dairy Technology* 64, 269-275.
- Vinderola G, Zacarías M F, Bockelmann W, Neve H, Reinheimer J and Heller K J (2012) Preservation of functionality of *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* INL1 after incorporation of freeze-dried cells into different food matrices. *Food Microbiology* 30, 274-280.
- Wang Y. C., Yu R. C. & Chou C. C. (2004). Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 209-217.
- Weinbreck, F., Bodnar, I., & Marco, M. L. (2010) Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International Journal of Food Microbiology* 136(3), 364-367.

- Wen-Chian Lian, Hung-Chi Hsiao, Cheng-Chun Chou. (2002) Survival of bifidobacteria after spray-drying. *International Journal of Food Microbiology* 74, 79 – 86.
- Wildman, R., 2007. Handbook of nutraceuticals and functional foods. Ed 2. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, EEUU.
- Ying D. Y., Phoon M. C., et al. (2010). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. *Journal of Food Science* 75(9), E588-E595.
- Zamora L. M., Carretero C. & Pares D. (2006). Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying. *Food Science and Technology International* 12, 77-84.
- Zavaglia G. A., Tymczyszyn E., De Antoni G., & Disalvo E. A. (2003). Action of trehalose on the preservation of *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* by heat and osmotic dehydration. *Journal of Applied Microbiology* 95, 1315–1320.
- Zayed G. & Roos Y. H.(2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry* 39, 1081-1086.
- Zhao G and Zhang G (2005) Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology* 99, 333–338.
- Zhao Z and Zhang G (2009) Influences of protectants, rehydration media and storage on the viability of freeze-dried *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25 1801–1806.
- Zhou X., Dong J., Gao J. & Yu Z. (2008). Activity-loss characteristics of spores of *Bacillus thuringiensis* during spray drying. *Food and Bioproducts Processing* 86, 37–42.