



Reutilización de residuos
de la soja (okara) para la
protección y crecimiento
de *Lactobacillus*
plantarum CIDCA
83114: Utilización de
técnicas innovadoras para
su encapsulación

TESIS 2020

Lic. Gabriel Sebastian Quintana

Directora: Andrea Gomez-Zavaglia

Codirector: Oscar Esteban Gerbino



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas



Reutilización de residuos de la soja (okara)
para la protección y crecimiento
de *Lactobacillus plantarum* CIDCA
83114: Utilización de técnicas
innovadoras para su encapsulación

Tesis Doctoral

Lic. Gabriel Sebastian Quintana

Directora: Andrea Gomez-Zavaglia

Codirector: Esteban Gerbino

2020

El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), CONICET-UNLP-CICPBA



Los resultados del presente trabajo de tesis han sido publicados en los siguientes artículos:

Quintana, G., Gerbino, E. and Gómez-Zavaglia, A. (2017). Okara: a nutritionally valuable by-product able to stabilize *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, spray-drying, and storage. *Frontier Microbiology*, 8:641.

Quintana, G., Simões, M. G., Hugo, A., Alves, P., Ferreira, P., Gerbino, E., ... and Gómez-Zavaglia, A. (2017). Layer-by-layer encapsulation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* using block-copolymers of poly (acrylic acid) and pluronic for safe release in gastro-intestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 35, 408-417.

Quintana, G., Gerbino, E. and Gomez-Zavaglia, A. (2018). Valorization of okara oil for the encapsulation of *Lactobacillus plantarum*. *Food Research International*, 106:81.

Quintana, G., Spínola, V., Martins, G. N., Gerbino, E., Gómez-Zavaglia, A., and Castilho, P. C. (2019). Release of health-related compounds during in vitro gastro-intestinal digestion of okara and okara fermented with *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Food Science and Technology*, 1-10.

Además se participó en ensayos experimentales del siguiente trabajo:

Cassani, L., **Quintana, G.,** Moreira, M. R., and Gómez-Zavaglia, A. (2018). Relationship between carbohydrate composition and fungal deterioration of functional strawberry juices preserved using non-thermal treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(9), 3271-3279.

AGRADECIMIENTOS.....

A mi directora Andrea, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su tiempo, por su gran dedicación, por transmitirme todos sus conocimientos y por siempre estar disponible, sin importar las distancias, para responderme cualquier duda y estar para lo que necesite.

A mi codirector Esteban, por toda su ayuda en estos 5 años, que desde un comienzo me transmitió todas sus buenas vibras, su energía, confiando en mí en cada proyecto que emprendimos, ayudandome en todo lo que necesité y estando presente en cada momento. Y más allá de lo laboral, por todo el tiempo compartido, por las charlas, por su amistad.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de La Plata, por haberme permitido realizar mi estudios de postgrado.

Al CONICET por haberme otorgado la Beca con la que pude realizar mis estudios.

A todos los integrantes del CIDCA, por el excelente trato, porque siempre que necesite me ayudaron, desde prestarme equipos, laboratorios y todo lo que haya necesitado en estos largos años, pero más allá de lo laboral, porque son excelentes personas y siempre me brindaron su apoyo, su buena onda, llevandome muy lindas amistades.

A mis queridísimos amigos del y fuera del box: Sabri, Lu, Manu, Meli, Martin, Feli, Susan, Agus, Nina, Dolo, Lina, Santi, Pau, Andre, Flor, porque con ellos todo este trayecto fue mucho más fácil, porque desde que llegue al box me recibieron de la mejor manera y día a día fui conociendo las excelentes personas que son. Gracias por cada momento compartido, por los mates, por las charlas, por las risas, por las anécdotas, por las juntadas, porque siempre estuvieron presente, bancandome en todas. Vine desde lejos sin saber con que me iba a encontrar y me encontré con personas excelentes, que hoy en día me llevo como amigos.

A todo el grupo de micro, porque desde el primer momento me trataron de la mejor manera, me ayudaron en todo lo que necesite, son un excelente grupo y todo este tiempo se hizo más llevadero gracias a ellos.

A Ayelen, que además de haber compartido proyectos en común y haber trabajado tiempo juntos en el laboratorio, conocí una gran persona, siempre con su gran energía y buena onda.

A mis queridos amigos de Tucuman que a pesar de las distancias, siempre estuvieron presente y sin ellos nunca sería lo mismo.

A mis padres, Mirta y Raul, que sin ellos no sería lo que soy hoy en día, y cada paso que logre fue gracias a su apoyo. A mis hermanos, Anto y Adrian, y a mi bella sobrina Catita, estando presentes en todo momento, siempre apoyandome, siempre bancandome en todas. Sin ellos nada sería igual y aunque cuesta estar lejos de casa, siempre estan presentes.

A Caro, mi compañera de vida, sin ella nada de esto sería posible. Tiempo atrás emprendimos este camino juntos, y pude llegar al final porque ella estuvo presente, acompañandome en cada momento, apoyandome, dandome fuerzas, y haciendo que cada día sea mas fácil.

Llegamos a La Plata sin tener conocimiento de como sería pero juntos nos abrimos camino, juntos logramos las metas. Gracias amor!!!! Y gracias a mi pequeñita y hermosa Guille, que llegó al final de toda esta etapa y que con su sonrisa de cada día me ilumina el alma, me hace feliz y hace que todo valga la pena.

!!!!!! MUCHAS GRACIAS A TODOS !!!!!!!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL

Residuo de la soja: Okara. Producción y usos de la soja	1
Okara: subproducto de la soja	4
Composición del okara	5
Usos del okara	8
Nutrición y salud: propiedades beneficiosas del okara	9
Bacterias lácticas	10
Bacterias lácticas como probióticos	11
Microencapsulación de probióticos	13
Tecnologías utilizadas en la microencapsulación de probióticos	17
Proceso de encapsulación	17
Procesos de preservación	18
Congelación	19
Liofilización	19
Secado en <i>spray</i>	21

OBJETIVOS GENERALES 24

CAPÍTULO I – Aprovechamiento del okara como medio de cultivo y matriz para el transporte y protección de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114

Introducción	25
Alimentos fermentados	25
Matrices alimentarias como vehículos de probióticos	26
Okara como matriz de fermentación	30
Okara como vehículo de antioxidantes	31

Objetivos específicos 33

Materiales y métodos	34
Okara: conservación y caracterización	34
Composición centesimal	34
Humedad	34
Proteínas	34
Lípidos	34
Cenizas	35
Determinación de fibra total	35
Espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR)	36
Microorganismos utilizados	36
Medios de cultivo y soluciones buffer	36
Caldo MRS	36
Okara entero y desengrasado	37
Buffer fosfato salino (PBS)	37
Condiciones de cultivo y cinética de crecimiento	37
Extracción de lípidos bacterianos	38

Caracterización de los ácidos grasos	38
Procesos de deshidratación y almacenamiento	39
Liofilización	39
Secado en <i>spray</i>	40
Condiciones de almacenamiento	40
Modelo matemático	41
Determinación de la actividad de agua	41
Preparación de las muestras para las determinación antioxidantes	41
Extracción de fitoquímicos	42
Digestión <i>in vitro</i>	43
Antioxidantes	45
Compuestos fenólicos totales (TPC)	45
Compuestos flavonoides totales	45
Determinación de antioxidantes <i>in vitro</i>	45
Ensayo de decoloración del catión radical ABTS (ABTS ^{•+})	45
Ensayo de la actividad anti radical (DPPH [•])	46
Actividad superóxido dismutasa (SOD) símil (O ₂ ^{•-})	46
Análisis estadístico y reproducibilidad de los resultados	47
Resultados y discusión	48
Caracterización del okara entero y desengrasado	48
Okara entero y desengrasado como medio de cultivo de <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114	50
Cinéticas de crecimiento	50
Efecto de la composición de ácidos grasos del medio	52
Efectos de los procesos de deshidratación sobre la recuperación y almacenamiento bacterianos	55
Viabilidad luego del proceso	55
Viabilidad de <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 durante el almacenamiento	58
Propiedades antioxidantes del okara fermentado con <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114	62
Puesta a punto de la extracción de fitoquímicos	63
Compuestos antioxidantes	66
Compuestos fenólicos totales (TPC)	66
Contenido total de flavonoides (TFC)	69
Actividad antioxidantes <i>in vitro</i>	72
Conclusiones	77
CAPITULO II – Sistemas de microencapsulación	
Introducción	78
Microencapsulación de bacterias lácticas	78
Técnicas de microencapsulación de bacterias lácticas	78
Emulsiones	78
Formación de emulsiones	79
Tecnología de microfluídica	82
Estabilidad de las emulsiones	84

Agentes emulsificantes	87
Caseína y lecitina como emulsificantes	88
Encapsulación <i>Layer-by-Layer</i> (LbL) (Capa por capa)	89
Deposición de las capas	90
Poliectrolitos	91
Poliectrolitos naturales	92
Poliectrolitos funcionalizados	93
Objetivos específicos	94

PARTE 1 – Uso del aceite de okara para la formulación de emulsiones estables

Materiales y métodos	95
Obtención y caracterización del aceite de okara	95
Preparación de las emulsiones aceite/agua (O/W)	95
Deshidratación de las emulsiones y almacenamiento	96
Liofilización	96
Secado en <i>spray</i>	96
Almacenamiento	96
Observaciones microscópicas	97
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	97
Análisis por microscopía láser confocal de barrido	97
Caracterización de las emulsiones deshidratadas	98
Contenido de humedad	98
Actividad de agua (a_w)	98
Tamaño de partícula, índice de polidispersión (Đ) y potencial zeta (ζ)	98
Ensayo acelerado de estabilidad oxidativa (Rancimat)	98
Índice de peróxido	99
Análisis estadístico	99
Resultados y discusión	100
Caracterización del aceite de okara	100
Observaciones microscópicas	101
Caracterización de las emulsiones	103
Estabilidad de las emulsiones	107
Estabilidad de los microorganismos encapsulados	111
Conclusiones	115

PARTE 2 – Técnicas innovadoras para la encapsulación bacteriana: A. Encapsulación capa por capa; B. Formación de emulsiones por microfluidización

Materiales y métodos	116
Síntesis del copolímero	116
Caracterización del copolímero	117
Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	117

Espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR)	117
Cepas y condiciones de crecimiento	117
Microorganismo utilizados	117
Condiciones de crecimiento	117
Encapsulación bacteriana <i>Layer-by-Layer</i> (LbL)	118
Evaluación de los encapsulados	119
Potencial zeta (ζ)	119
Cinética de crecimiento por determinación de la absorbancia	119
Microscopía confocal	119
Proceso de deshidratación y almacenamiento	120
Liofilización	120
Almacenamiento	120
Exposición a condiciones gastro-intestinales simuladas	120
Actividad deshidrogenasa mitocondrial (MTT)	121
Preparación de los dispositivos microfluídicos	121
Formulación de las emulsiones	124
Armado del equipo	124
Preparación de las emulsiones agua/aceite (W/O)	126
Liofilización y conservación	127
Microscopía de fluorescencia	127
Digestión gastro-intestinal simulada	128
Análisis estadístico	128

Parte A

Resultados y discusión	129
Síntesis y caracterización de los copolímeros	129
Evaluación de los parámetros de encapsulación	131
Determinación del potencial ζ	131
Parámetros de crecimiento	133
Efecto de la liofilización sobre las bacterias encapsuladas	136
Análisis por microscopía confocal	138
Simulación de la digestión gastro-intestinal	140
Evaluación de la toxicidad de los polímeros frente a células intestinales	143

Conclusiones	145
---------------------	-----

Parte B

Resultados y discusión	146
Encapsulación de <i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114 en emulsiones W/O por microfluídica	146
Microscopía de las emulsiones O/W	151
Digestión gastro-intestinal simulada	155

Conclusiones	158
---------------------	-----

CAPITULO III – Análisis del Ciclo de Vida del okara (entero y desengrasado) fermentado con *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114

Introducción	159
Herramienta coputacional	162
Objetivos específicos	163
Materiales y métodos	164
Alcance del proceso	164
Descripción del proceso completo para la producción de okara fermentado	164
Proceso de conservación	165
Proceso de desengrasado	165
Proceso de fermentación	165
Proceso de deshidratación y almacenamiento	165
Recopilación de datos del inventario y asignación del enfoque	166
Evaluación del impacto	168
Resultados y discusión	170
Conclusiones	173
DISCUSIÓN GENERAL	174
BIBLIOGRAFÍA	180

INTRODUCCIÓN GENERAL

Introducción General

1. Residuo de la Soja: Okara

1.1. Producción y usos de la soja

La soja es un cultivo importante como fuente de proteínas para animales y seres humanos (Friedman y Brandon, 2001). El último informe del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) estimó que la producción mundial de soja en el año 2016/2017 fue de 323.7 millones de toneladas, incrementándose 10.4 millones de toneladas en comparación con el período anterior (USDA, 2017). Actualmente, Estados Unidos es el mayor productor de soja a nivel mundial, seguido de Brasil y Argentina, cuya cosecha conjunta fue de 277.63 millones de toneladas en el período 2015/2016 y representó el 82.8% de la producción mundial (USDA, 2017). En un segundo grupo de productores se encuentran China, Paraguay, India y Canadá, aunque la producción conjunta de todos ellos (y del resto de los países a nivel mundial) no supera a la producción de Argentina (**Figura 1**).

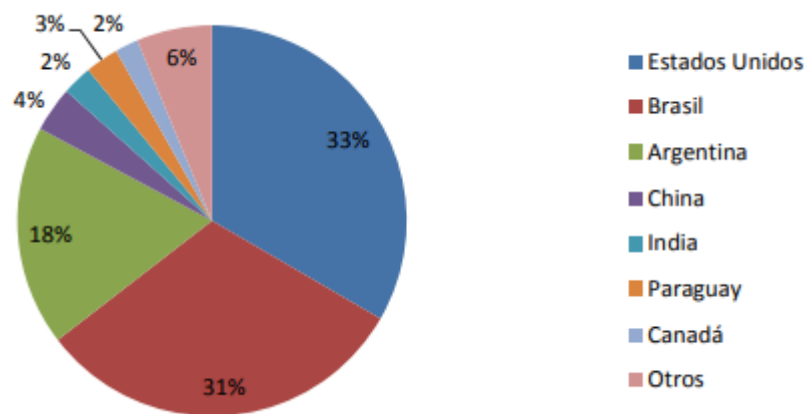


Figura 1. Principales países productores de soja (período 2015/2016)

Según el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en Argentina la soja es el principal cultivo, no sólo por la producción, sino también por la superficie ocupada (Calviño y Monzon, 2009; Sadras y Calderini, 2009). En la actualidad representa el 55% de las casi 37 millones de hectáreas que se siembran, seguida muy de lejos por los cultivos de maíz y trigo, que en conjunto representan el 26%, es decir, menos de la mitad. El volumen de soja cosechado en promedio en los últimos 10 años es de 49 millones de toneladas. Durante el período 2014/2015, se alcanzó el pico máximo de

producción, superándose los 61 millones de toneladas para una superficie sembrada de 19.8 millones de hectáreas.

Debido a su elevado contenido proteico, se estima que el 75 % de la soja que se produce se destina a la alimentación animal. Normalmente, el 85 % de los granos de soja se usan para extraer el aceite, mediante procesos de extracción con hexano o mecánicos, generándose como subproducto la harina de soja, rica en proteínas, y destinada casi exclusivamente a la alimentación animal. El aceite de soja, luego de ser sometido a procesos de refinamiento, se emplea para la alimentación humana, ya sea de forma directa o como ingrediente en productos de panadería. Otro uso del aceite de soja es como biocombustible, en jabones y cosmética, entre otros (Karasulu *et al.*, 2011; Latheef, 2012). Sólo el 6 % - 10 % de los granos de soja se destinan al consumo humano, ya sea de forma directa o como tofu, bebida de soja, salsa de soja o miso (Figura 2).

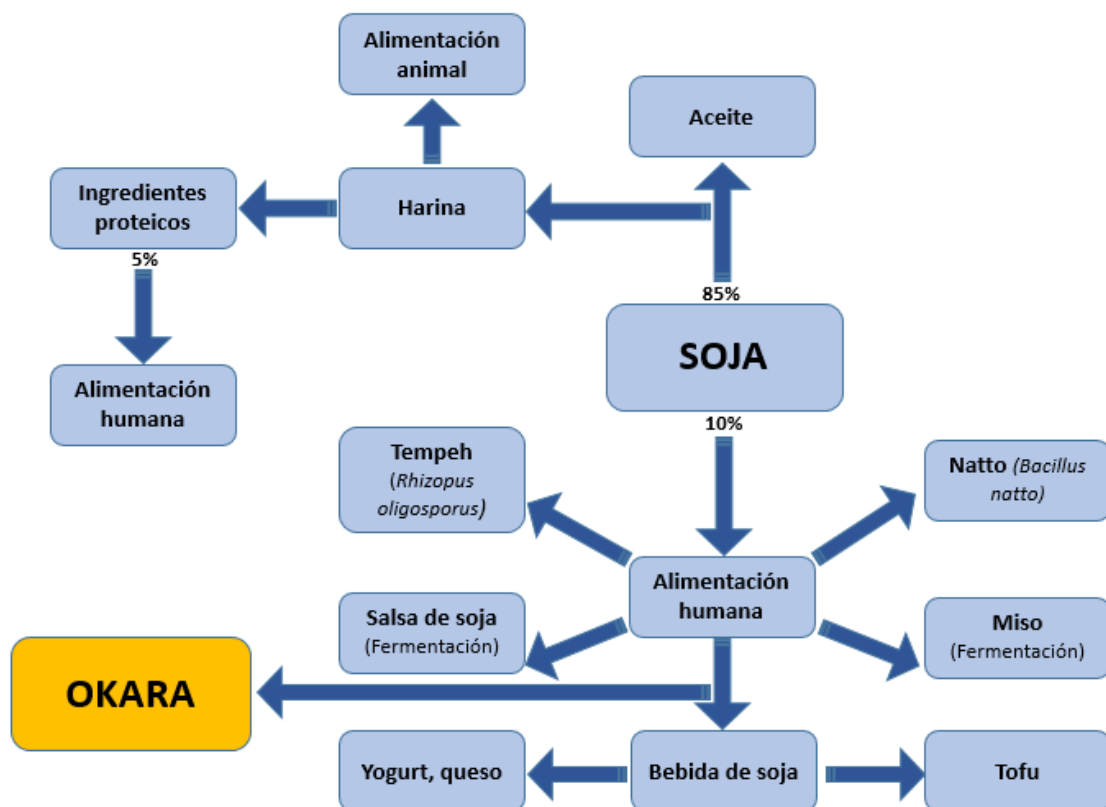


Figura 2. Usos de la soja (adaptado de Riaz, 2006)

Además, luego de procesos de transformación, el 4 – 5 % de la harina de soja se utiliza en la formulación de alimentos (análogos cárnicos, bebidas proteicas, barras energéticas o incluso fórmulas infantiles) (Riaz, 2006). Tradicionalmente, en los países

asiáticos los granos de soja se utilizan para la producción de bebida de soja, tofu o productos fermentados, mientras que en los países occidentales, se extraen las proteínas de soja y se las utiliza como ingrediente en la formulación de otros productos (Prestamo *et al.*, 2007; Riaz, 2006).

El principal destino de la soja cosechada en la Argentina es la industria. Del procesamiento industrial de la soja, se obtienen productos destinados al mercado interno y también a la exportación. Entre ellos, cabe mencionar el aceite de soja en bruto, harinas, pellets y *expellers* del aceite de soja (subproducto obtenido luego de la extrusión y prensado), biodiesel, aceite de soja refinado, semilla, glicerol, lecitina y otros residuos sólidos extraídos del aceite (Ybran y Lacelli, INTA 2016) (**Figura 3**).

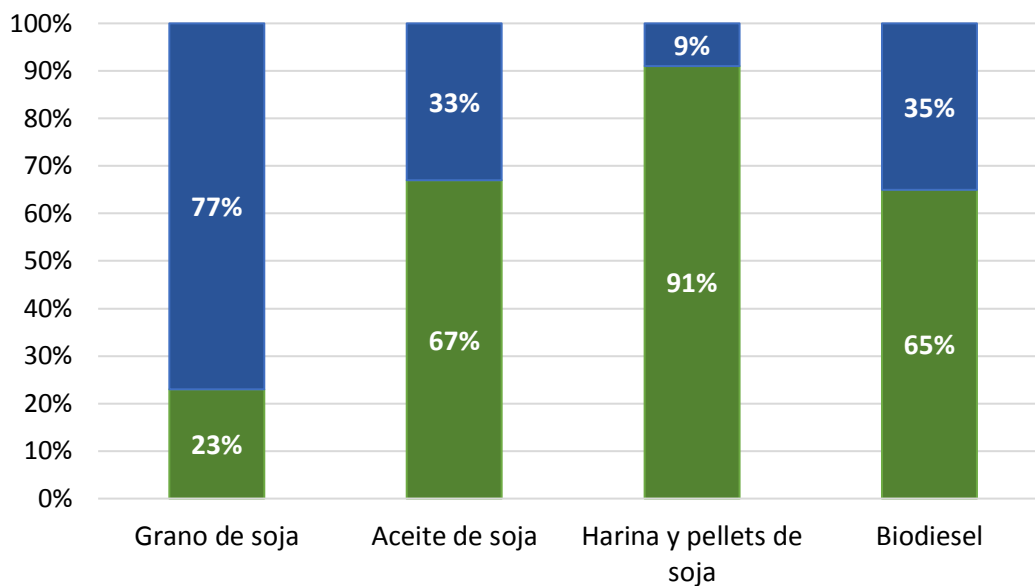


Figura 3. Destino de los productos obtenidos de la soja en Argentina. Zona azul: consumo interno; zona verde: exportaciones

Además de los avances en la producción de soja, el consumo de alimentos a base de soja ha aumentado no sólo por sus características químicas y nutricionales (*e.g.*, alto contenido de proteínas, composición rica en ácidos grasos insaturados e isoflavonas) sino también por sus efectos beneficiosos en la salud humana y nutrición. Estas propiedades beneficiosas han despertado gran interés por parte de la industria alimentaria, que procura incorporarlos en la formulación de diversos alimentos, convirtiéndolos así en alimentos funcionales, es decir, alimentos que otorgan propiedades beneficiosas que van más allá de las propiedades intrínsecas del alimento (Genovese y Lajolo, 2002). Algunas de estas propiedades funcionales incluyen la

disminución del colesterol plasmática, la prevención del cáncer, la diabetes y la obesidad, además de la protección contra enfermedades intestinales y renales (Friedman y Brandon, 2001).

1.2. Okara, subproducto de la soja

Durante la producción de alimentos derivados de la soja, se originan diferentes desechos. En Argentina, de la molienda del grano de soja se obtienen subproductos que son los residuos sólidos resultantes de la extracción industrial del aceite. Si el método utilizado para extraer el aceite fue la presión, los residuos se denominan *expellers* mientras que, si fue a través de la aplicación de solventes, se llaman harinas. Por otra parte, de la producción de bebidas a base de soja se obtienen residuos denominados **okara** (Ybran y Lacelli, INTA, 2016; Li, Qiao y Lu, 2012; Li *et al.*, 2013).

El okara es el residuo sólido remanente de la molienda de los granos de soja, después de la extracción de la fracción acuosa utilizada para producir bebidas de soja. Por cada **1 kg de soja utilizado**, se obtienen aproximadamente **1.1-1.2 kg de okara** fresco. Normalmente, las industrias descartan los subproductos del procesamiento de alimentos, lo que lleva a serios problemas medioambientales. Por ello, la búsqueda de usos alternativos y el agregado de valor a estos subproductos ha ganado mucha atención en los últimos años (Scialabba, 2014). Anualmente, se producen grandes cantidades de okara, especialmente en países asiáticos con alto consumo de soja (Khare *et al.*, 1995; Li, Qiao y Lu, 2012; Villanueva-Suárez *et al.*, 2016). En Corea, la cantidad de okara generado es de 310000 toneladas, mientras que en Japón se producen 800000 toneladas y en China, 2800000 toneladas (Ahn *et al.*, 2010; Li, Qiao y Lu, 2011; Muroyama *et al.*, 2006). Si bien no se dispone de estos datos para Argentina, es un hecho inexorable que las empresas productoras de bebida de soja, o bebidas a base de soja (*e.g.* ADES®), generan grandes cantidades de okara, lo cual origina un serio problema medioambiental si no es tratado adecuadamente.

La mayor parte del okara se descarta, ya que su alto contenido de humedad (80%) lo hace muy perecedero, imposibilitando su uso sin un tratamiento previo. Actualmente, el okara es descartado o quemado, lo que puede causar problemas medioambientales debido a posibles plagas o al aumento de la emisión de CO₂. En los últimos veinte años,

ha habido un creciente interés en las formas de reutilizar el okara. La incorporación directa de okara en alimentos para animales o humanos es posible, pero tiene algunas limitaciones debido a la presencia de inhibidores enzimáticos (si las semillas de soja no se tratan térmicamente antes de la molienda). Además, los oligosacáridos presentes en el okara pueden causar flatulencia y sabores no deseados (Anderson y Wolf, 1995; Li y Ma, 2014; Mateos-Aparicio *et al.*, 2010a).

1.2.1. Composición del okara

La composición del okara puede variar debido a diferentes factores, tales como:

1. la variedad de grano de soja cultivado;
2. el método por el cual se obtiene la bebida de soja;
3. la cantidad de componentes solubles en agua extraídos a partir de la soja molida;
4. los métodos de análisis utilizados.

La composición general de okara se muestra en la **Tabla 1**. El contenido de proteínas y lípidos, la composición de ácidos grasos y la actividad lipoxigenasa varían en los diferentes cultivos de soja.

El método de obtención de la bebida de soja determina la composición del okara, tal como se puede observar en la **Figura 4**. Existen dos métodos para la obtención de la bebida de soja: japonés o chino. En el método japonés, los granos de soja remojados se calientan antes de ser molidos y filtrados. Por el contrario, en el método chino, los granos de soja son primeramente remojados, molidos y filtrados, y luego se calientan (O'Toole, 1999).

Tabla 1. Composición general del okara

Macrocomponentes	Concentración (g/100 g base seca)
Carbohidratos	3.8-5.3
Proteínas	15.2-33.4
Lípidos	8.3-10.9
Fibra dietaría	42.4-58.1
Fibra insoluble	40.2-50.8
Fibra soluble	4.2-14.6
cenizas	3.0-4.5
Microcomponentes	Concentración (mg/100 g base seca)
Tiamina (B1)	0.48-0.59
Riboflavina (B2)	0.03-0.04
Niacina (B3)	0.82-1.04
K	936-1350
Na	16-96
Ca	260-428
Mg	130-165
Fe	0.6-11
Cu	0.1-1.2
Mn	0.2-3.1
Zn	0.3-3.5
Fitoquímicos	Concentración (g/100 g base seca)
Isoflavonas agliconas	5.41
Isoflavonas glucosidas	10.3
Glucósidos de malonilo	19.7
Glucósidos de acetilo	0.32
Ácido Fítico	0.5-1.2
Saponinas	0.10

Referencias: Anderson y Wolf (1995), Jackson *et al.* (2002), Li *et al.* (2012), Redondo-Cuenca *et al.* (2008), van der Riet *et al.* (1989).

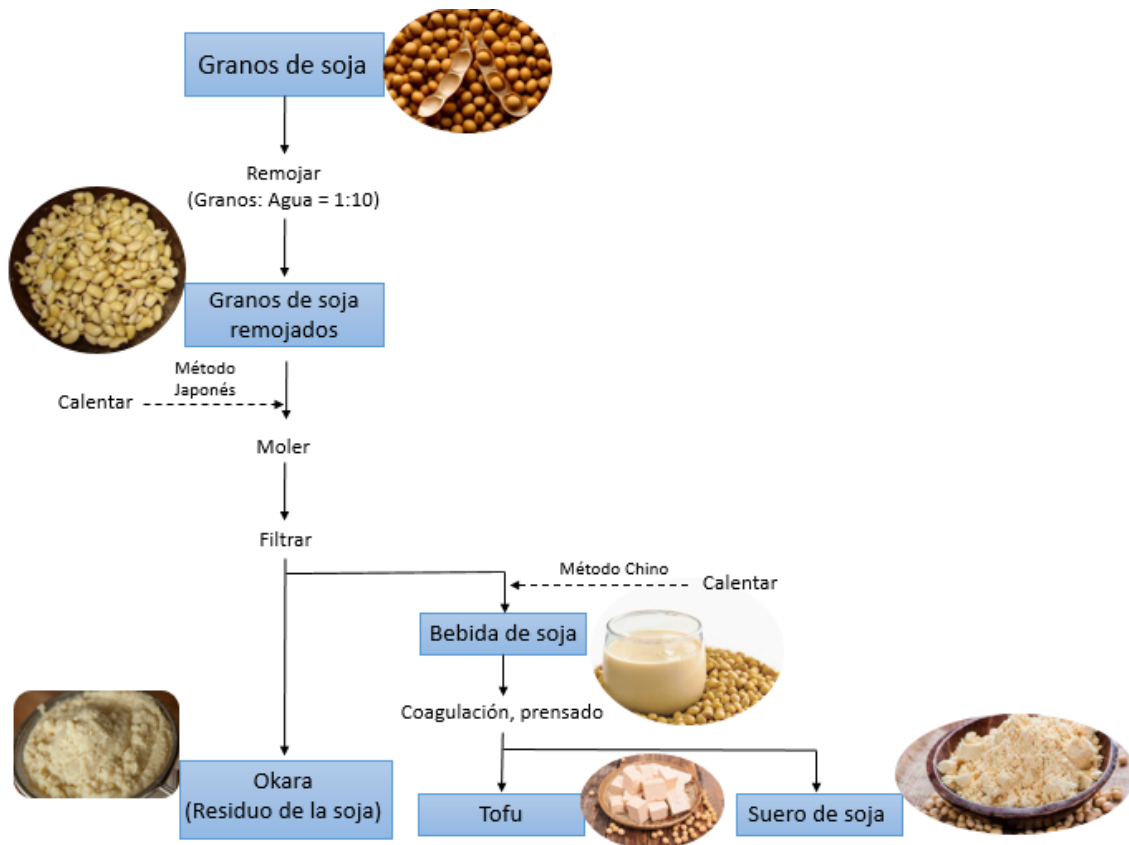


Figura 4. Generación de okara durante la producción de tofu y bebida de soja

El okara tiene un alto contenido de humedad, calculado en *ca.* 70-80%. La mayor parte del agua está unida a la fibra, presentando una apariencia grumosa y una estructura que se asemeja al aserrín húmedo. La fibra, principalmente fibra insoluble (en forma de celulosa y hemicelulosa), se presenta en un 40 – 60% en base seca (Redondo-Cuenca *et al.*, 2008; van der Riet *et al.*, 1989). El porcentaje de azúcares libres (como arabinosa, glucosa, galactosa, fructosa, sacarosa, rafinosa y estaquiosa) es bajo, de *ca.* 4-5% (Redondo-Cuenca *et al.*, 2008).

El porcentaje de proteínas del okara (base seca) es de 15.2-33.4%, siendo la globulina 7S y la globulina 11S las proteínas principales (Singh *et al.*, 2015). Los aislados de proteína de okara presentan todos los aminoácidos esenciales pero tienen baja solubilidad en agua (Chan y Ma., 1999). Por otra parte, las proteínas de okara resisten la digestión completa por parte de las enzimas gastrointestinales, pepsina y pancreatina (Jimenez-Escrig *et al.*, 2010). Los inhibidores de tripsina, sustancias que impiden el uso o metabolismo enzimático de las proteínas, representan alrededor del 5.19-14.4% de

las proteínas de okara, aunque pueden inactivarse con un tratamiento térmico adecuado (Stanojevic *et al.*, 2013).

El okara presenta una concentración considerable de lípidos, con un porcentaje de 8.3-10.9% (base seca). La mayoría de los ácidos grasos son mono o poliinsaturados, y consisten en ácido linoleico (54.1% del total de ácidos grasos), ácido oleico (20.4%), ácido palmítico (12.3%), ácido linolénico (8.8%) y ácido esteárico (4,7%) (Mateos-Aparicio *et al.*, 2010a). Durante la etapa de molienda de los granos de soja, la lipooxigenasa de soja y la hidroperóxidoliasa reaccionan con los ácidos grasos insaturados, principalmente el ácido linoleico, lo que lleva a la formación de compuestos aromáticos como los aldehídos y alcoholes de hexilo y nonilo. Además, el okara presenta niveles de isoflavonas de alrededor del 12-30%. Las isoflavonas de la soja quedan en el okara durante la producción de la bebida (Jackson *et al.*, 2002; Wang y Murphy, 1996). Las principales isoflavonas en okara son los glucósidos (28.9%) y las agliconas (15.4%), con una proporción menor de acetilgenistina (0.89%) (Jackson *et al.*, 2002). La β -glucosidasa puede hidrolizar enzimáticamente los glucósidos de isoflavona a sus formas de aglicona, que muestran una mayor biodisponibilidad en humanos (Izumi *et al.*, 2000).

1.2.2. Usos del okara

El okara deshidratado contiene aproximadamente 50% de fibra dietética, 25% de proteínas y 10% de lípidos (Lu *et al.*, 2013), siendo una excelente ingrediente alimentario, especialmente en la formulación de productos horneados, no sólo para enriquecer alimentos, sino también como una forma de usarlo y dar valor agregado a este residuo (Vong y Liu, 2016).

Sin embargo, el proceso de secado de okara generalmente consume mucha energía dada la gran cantidad de agua que contiene. Además, el análisis económico también ha demostrado que el costo del secado de okara excede en gran medida el valor de la proteína (Redondo-Cuenca *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013). Por esta razón, es necesario aplicar nuevas tecnologías al tratamiento del okara que permitan agregarle valor y usarlo como ingrediente a nivel industrial. Así, la biotransformación del okara mediante el uso de microorganismos de interés industrial proporciona una alternativa para agregar valor a este subproducto de procesamiento de alimentos de soja.

El okara puede ser usado como pienso para alimentar ganado, pero al igual que para el consumo humano, debe ser secado o esterilizado previamente (Li *et al.*, 2012), como medio de cultivo para hongos filamentosos o bacterias por su alto valor nutricional (Hsieh y Yang, 2004), como fertilizante para uso agrícola (Li *et al.*, 2013), para la obtención de ingredientes funcionales (fibra alimentaria, proteínas) (Mateos-Aparicio *et al.*, 2010), como ingrediente bajo en calorías y rico en fibra en productos de panadería, repostería o *snacks* (Tseng *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2012; Radocaj y Dimic, 2013).

1.2.3. Nutrición y salud: propiedades beneficiosas del okara

Debido a su elevada concentración de fibra, proteínas, isoflavonas y elementos minerales, el okara posee un alto valor nutricional y efecto prebiótico (Pérez-López *et al.*, 2016). Por esta razón, podría considerarse un subproducto funcional con propiedades beneficiosas para la salud (Jiménez-Escrig *et al.*, 2008).

Los prebióticos son sustancias utilizadas selectivamente por los microorganismos del huésped que confieren un beneficio para la salud (Gibson *et al.*, 2017). Los compuestos con propiedades prebióticas demostradas no se hidrolizan en la parte superior del tracto gastrointestinal, por lo que llegan de manera intacta al intestino, donde son fermentados por las bacterias de la microbiota intestinal, mejorando selectivamente su crecimiento y/o actividad (Gibson *et al.*, 2010). Por lo tanto, su incorporación a las formulaciones de probióticos representa una estrategia interesante, ya que pueden garantizar la llegada segura de probióticos al intestino humano, proporcionando también los beneficios derivados de la ingesta de prebióticos. Esta función relativamente novedosa de estos ingredientes alimenticios ofrece formas innovadoras para el desarrollo de alimentos funcionales que combinan ventajas tecnológicas y fisiológicas. Por su composición y propiedades fisicoquímicas, el okara, un subproducto rico en fibra, cuyas propiedades prebióticas han sido demostradas (Pérez-López *et al.*, 2016) constituye *a priori* una matriz adecuada para garantizar la llegada de probióticos al intestino. Por ello, su incorporación como ingrediente alimentario brindaría beneficios adicionales a nuevos alimentos funcionales.

El okara es capaz de ser fermentado por bacterias beneficiosas para la salud intestinal, tales como *Bifidobacterium bifidum* (Espinosa-Martos y Rupérez, 2009). El

okara contiene una baja cantidad de fibra soluble, que es la que mayor efecto prebiótico tiene, en especial los oligosacáridos (Courtois, 2009; Charalampopoulos y Rastall, 2012; Corzo *et al.*, 2015). Además, se informó que algunas fibras insolubles del okara también son parcialmente fermentables por bacterias beneficiosas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Espinosa-Martos y Rupérez, 2009; Slavin, 2013; Tu *et al.*, 2014).

Asimismo, el okara es capaz de mejorar la absorción de minerales, en especial el calcio, y por tanto, otorga beneficios en huesos, previniendo la osteoporosis (Tenorio *et al.*, 2010).

El okara es una fuente rica de fibra, y una dieta rica en fibra, cuyo consumo contribuye a un menor aporte de energía en la dieta, lo que conduce a la pérdida de peso corporal (Matsumoto *et al.*, 2007). Este efecto se genera a expensas de la reducción de la grasa corporal y además, es proporcional a la dosis de fibra (Tucker y Thomas, 2009; Lattimer y Haub, 2010; Ötles y Ozgoz, 2014). Asimismo, una dieta con elevado contenido de fibra ha sido asociada a un menor riesgo de padecer infartos y enfermedad vascular periférica (Merchant *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2009). Por lo tanto, el consumo de fibra soluble permite disminuir los niveles de colesterol LDL (*Low Density Lipoprotein*) y de la presión arterial sistólica y diastólica, disminuyendo el riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular (Anderson *et al.*, 2009).

Por otro lado, una dieta con una mayor cantidad de carbohidratos de menor índice glucémico (carbohidratos complejos), disminuiría la probabilidad de padecer diabetes (Meyer *et al.*, 2000; Schulze *et al.*, 2004). La fibra es capaz de regular la glucosa en sangre y la liberación de insulina luego de consumir los alimentos. La viscosidad de la fibra afecta la absorción de la glucosa, resultando en una menor concentración de glucosa en sangre (García *et al.*, 2007; Behall *et al.*, 2006).

Finalmente, se informó que hidrolizados proteicos y polisacáridos del okara (y de la soja) tienen propiedades antioxidantes, debido a la reducción y efecto quelante de radicales libres (Yokomizo *et al.*, 2002; Mateos-Aparicio *et al.*, 2010).

2. Bacterias Lácticas

Las bacterias lácticas constituyen un grupo de microorganismos que producen ácido láctico como único o principal producto de la fermentación de carbohidratos. Se

trata de cocos o bacilos Gram positivos no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes, oxidasa y catalasa negativas, y que carecen de citocromos (Carr *et al.*, 2002). En función del metabolismo de los carbohidratos, las bacterias lácticas se dividen en **homofermentativas** (producen exclusivamente ácido láctico como producto de fermentación), y **heterofermentativas** (además de ácido láctico producen otros metabolitos, tales como propiónico, acético, etc). Además, las bacterias lácticas son tolerantes al ácido, pudiendo crecer a valores bajos de pH ($\text{pH} \leq 4$). Entre los principales géneros de bacterias lácticas se encuentran: *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (König *et al.*, 2009). Algunos autores incluyen también al género *Bifidobacterium*. Sin embargo, aunque las bifidobacterias producen ácido láctico (y acético) como producto final de fermentación, este género es diferente tanto desde el punto de vista filogenético como desde el punto de vista bioquímico (König *et al.*, 2009).

Las bacterias lácticas, en general, y los lactobacilos en particular, juegan un papel importante en la salud y bienestar humano y animal. Fueron consideradas por la FDA (Food and Drug Administration de EEUU) como GRAS (Generally Recognized as Safe) y constituyen los microorganismos más ampliamente utilizados como *starters* en la industria, en la fabricación de diferentes alimentos (*e.g.*, queso, yogurt, carnes fermentadas, pescado y vegetales) y también como inoculantes para ensilados (Albano *et al.*, 2009; Gerez *et al.*, 2009; Giraffa *et al.*, 2010).

2. 1. Bacterias lácticas como probióticos

Desde el punto de vista etimológico, el término *probiótico* significa "para la vida". La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO/OMS), define a los probióticos como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped" (FAO/OMS, 2002; Frias *et al.*, 2016). Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los que más se utilizan como probióticos (Fijan, 2014; Vlasova *et al.*, 2016; Fenster *et al.*, 2019). Los probióticos ejercen sus propiedades beneficiosas a diferentes niveles, entre los cuales se encuentran una mayor resistencia a infecciones, reducción del colesterol sérico, reducción de la concentración de sustancias tóxicas a nivel intestinal, inhibición del

crecimiento de bacterias potencialmente perjudiciales para el organismo, inmunomodulación, entre los más importantes (Dunne *et al.*, 2001; Patel y Goyal, 2013).

El conocimiento acerca de los efectos beneficiosos de los probióticos sobre la salud humana incentivó su mayor consumo en los últimos años, principalmente en forma de productos lácteos. Asimismo, se han incrementado los estudios acerca de la incorporación de bacterias probióticas en alimentos no lácteos tales como jugos, golosinas, cereales (Saarela *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011) y alimentos de origen vegetal ricos en fibra (Sendra *et al.*, 2008; Tavera-Quiroz *et al.*, 2015).

Diversos factores influyen en la viabilidad de los probióticos durante el procesamiento y almacenamiento de productos alimenticios. Entre ellos se encuentran **parámetros intrínsecos del alimento**, tales como pH, acidez, oxígeno disuelto, actividad de agua, presencia de sal, azúcar y otros compuestos (*e.g.*, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, saborizantes y colorantes artificiales, entre otros). Por su parte, los **parámetros de procesamiento** incluyen las condiciones de fermentación (*e.g.*, temperatura, presencia de oxígeno), los tratamientos térmicos, las condiciones de enfriamiento y almacenamiento del producto, el material de los envases y la escala de producción. Por último, entre los **factores microbiológicos** que afectan la viabilidad de los probióticos se encuentran la cepa utilizada y la concentración de inóculo (Putta *et al.*, 2018; Grattepanche y Lacroix, 2013).

En condiciones ideales, la cepa a utilizar debería ser estable en las matrices alimentarias para poder generar los efectos beneficiosos sobre el huésped al ser consumida. Para ello, los probióticos deben ser capaces de soportar las condiciones de procesamiento, manteniendo su funcionalidad luego de los mismos y durante el almacenamiento. Además, los probióticos incorporados en alimentos no deben alterar la calidad del producto ni las propiedades organolépticas (Del Piano *et al.*, 2006).

El incremento de alimentos funcionales en el mercado genera un aumento en su demanda por parte de las industrias alimentarias, lo que obliga a implementar nuevas tecnologías que garanticen una elevada viabilidad luego de la producción a gran escala. La sensibilidad al oxígeno y la acidez son los inconvenientes más importantes para el procesamiento y escalado de cepas probióticas de origen intestinal. Para evitar estos inconvenientes, generalmente se utilizan tecnologías de microencapsulación (Gbassi *et al.*, 2009; Heidebach *et al.*, 2010; Sandoval-Castilla *et*

al., 2010), que permiten mantener la viabilidad durante el procesamiento, almacenamiento y pasaje a través del tracto gastrointestinal. Por lo tanto, la selección de cepas y el uso de tecnologías adecuadas resultan cruciales en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales que contengan probióticos.

3. Microencapsulación de probióticos

La encapsulación de componentes bioactivos se utiliza en diversas aplicaciones en la industria alimentaria, tales como el control de reacciones de oxidación, enmascaramiento de sabores, colores y olores, extensión de la vida útil, entre otras. Estas técnicas también son utilizadas para proteger a los microorganismos probióticos tanto de los factores que pueden alterar su viabilidad en el producto final, como de las condiciones adversas del tracto gastrointestinal. Como el tamaño de los microorganismos se encuentra entre 1 y 5 μm , sólo la microencapsulación es una opción válida, quedando excluidas técnicas de "nanoencapsulación" (Cassani *et al.*, 2019).

La microencapsulación se ha convertido en una de las estrategias más utilizadas para mantener la viabilidad de probióticos. La microencapsulación se define como "la tecnología empleada para el recubrimiento 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 provee una barrera física entre el microorganismo y los otros componentes del producto, protegiéndolo frente a diferentes ambientes adversos. (Desai y Park, 2005; Champagne y Kailasapathy, 2008; Zuidam y Shimodi, 2010).

De forma simplificada, una microcápsula es una pequeña esfera con una pared uniforme. El material dentro de la microcápsula se conoce como núcleo, fase interna, o de relleno, mientras que la pared externa se denomina cáscara, revestimiento o membrana (Das *et al.*, 2011). 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, el compuesto encapsulado se conoce como **núcleo** y el agente encapsulante, como **pared**. El núcleo puede incluir uno o varios ingredientes, y la pared puede constar de una o más capas (simple o doble capa). La retención de los núcleos está determinada

por su funcionalidad química, solubilidad, polaridad y volatilidad (Poshadri y Aparna, 2010).

Los agentes encapsulantes (pared) son generalmente matrices de grado alimentario. La selección del agente de encapsulación representa un desafío, ya que los materiales utilizados deben cumplir requisitos **tecnológicos** (resistentes a las condiciones de procesamiento), **regulatorios** (reglamentaciones de organismos nacionales -Código Alimentario Argentino- o internacionales -EFSA, FDA-) y de **estabilidad** durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal (Chávarri *et al.*, 2012; Serna-Cook y Vallejo-Castillo, 2013). Por todas estas razones, los materiales seleccionados deben ser generalmente reconocidos como seguros (GRAS) y estables en el tracto gastrointestinal superior, pero inestables en el intestino, donde deben liberarse los microorganismos (Würth *et al.*, 2015). Entre los materiales más ampliamente utilizados se encuentran polisacáridos, proteínas y lípidos, que actúan ya sea de manera individual como conjunta (de Souza Simões *et al.*, 2017). El uso de los materiales de grado alimentario garantiza la ausencia de citotoxicidad y la seguridad de los productos de biodegradación (Cook *et al.*, 2012).

Generalmente, la encapsulación se realiza en dos etapas:

- 1- La incorporación del compuesto bioactivo o bacterias (núcleo) mediante disolución o dispersión (si la matriz es líquida), o aglomeración o adsorción (si la matriz es sólida);
- 2- La estabilización mediante procesos físicos (evaporación, solidificación), químicos (polimerización), o fisicoquímicos (gelificación) (Burgain *et al.*, 2011).

Dependiendo de las propiedades fisico-químicas del núcleo, de la composición de la pared, y de la técnica de microencapsulación utilizada, se pueden obtener diferentes sistemas de encapsulación: del tipo reservorio y del tipo matriz (**Figura 5**).

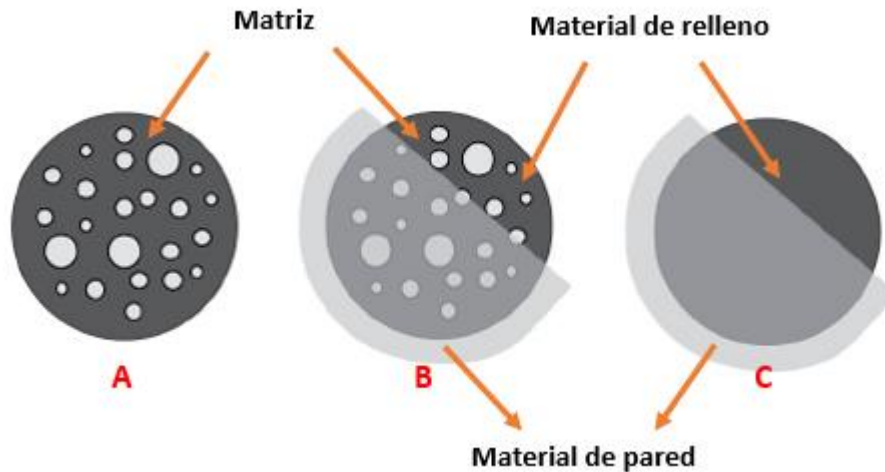


Figura 5. Representación esquemática de sistemas de encapsulación: A. Tipo matriz; B. Tipo matriz recubierta; C. Tipo reservorio (Burgain *et al.*, 2011)

En el caso del sistema de encapsulación del **tipo matriz**, el agente activo se dispersa sobre el material de soporte y sobre la superficie. El encapsulado **tipo reservorio** posee una capa alrededor del material del núcleo y por ello se suele llamar también cápsula. La combinación de estos dos tipos da lugar a una tercera clase de cápsula, la **matriz recubierta**, donde el agente activo es recubierto por un revestimiento (Burgain *et al.*, 2011).

La microencapsulación ayuda a separar el núcleo central de su entorno hasta su liberación. De esta manera, el núcleo (en esta tesis, las bacterias lácticas) queda protegido frente a diversos factores adversos (*e.g.*, acidez, concentración de oxígeno y condiciones gástro-intestinales), mejorando su estabilidad y vida media, y permitiendo una liberación controlada en función del material de encapsulación empleado. (Champagne y Kailasapathy, 2008; Burgain *et al.*, 2011).

Al momento de desarrollar un producto probiótico encapsulado seguro y eficaz, es crítico mantener un número adecuado de células viables durante la vida útil del producto hasta el momento de consumirlo (Shah y Lankaputhra, 1997; Desmond *et al.*, 2002). Diversos organismos nacionales e internacionales, entre ellas la Federación Internacional de Lechería (FIL), el Código Alimentario Argentino, la EFSA y la FDA, requieren un mínimo de 10^6 - 10^7 unidades formadoras de colonias de probióticos por gramo de alimento (UFC/g) al momento del consumo, para garantizar sus efectos beneficiosos sobre la salud del consumidor (FAO/OMS, 2002; Mortazavian *et al.*, 2007).

Diferentes factores determinan la viabilidad bacteriana luego de la encapsulación. Entre ellos pueden mencionarse el tipo y la concentración del material de la pared, el tamaño de la cápsula, el número de bacterias iniciales y la cepa utilizada (Chen y Chen, 2007). Las ventajas que presenta la microencapsulación de probióticos son (**Figura 6**):

- Protección y supervivencia de los microorganismos en los alimentos;
- Mejoramiento de la estabilidad, manipulación y almacenamiento bacteriano;
- Incorporación de microorganismos probióticos encapsulados en productos lácteos como yogurt, queso y productos lácteos congelados.
- Protección de probióticos frente al oxígeno, la congelación y las condiciones ácidas durante el procesamiento, almacenamiento y pasaje a través del tracto gastrointestinal (Ningtyas *et al.*, 2019).

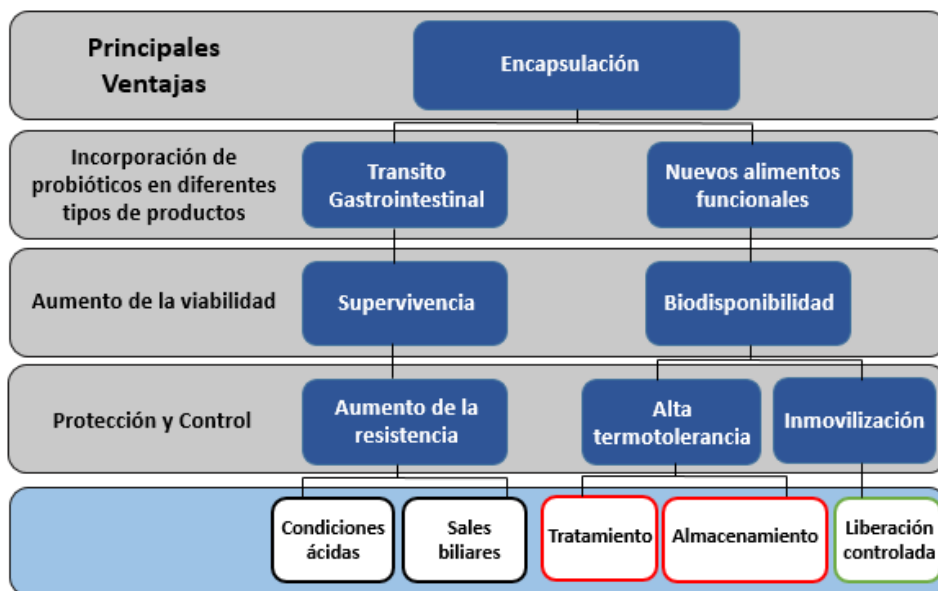


Figura 6. Presentación esquemática de las principales ventajas de la encapsulación de probióticos a nivel fisiológico (pasaje a través del tracto gastrointestinal) y tecnológico (incorporación en alimentos funcionales).

Para evaluar la efectividad del proceso de encapsulación, se deben tener en cuenta diferentes parámetros, tales como la viabilidad de los microorganismos después de exponerlos a condiciones ambientales adversas, el tiempo necesario para la formación de la cápsula, la capacidad de liberación de las bacterias y la recuperación bacteriana (Mortazabian *et al.*, 2007; Borgogna *et al.*, 2010). Estos factores pueden

superarse seleccionando el método de encapsulación, el material de la pared y las condiciones de procesamiento adecuadas.

3.1. Tecnologías utilizadas en la microencapsulación de probióticos

Las técnicas más utilizadas para la microencapsulación de microorganismos probióticos son la emulsificación, la extrusión, y el secado en *spray* (Rokka y Rantamäki 2010). En estos métodos, las bacterias probióticas quedan atrapadas en la matriz del material encapsulante, dando lugar a la formación de microcápsulas de diferentes tamaños y tipos (Champagne y Fustier, 2007).

Las **técnicas de deshidratación** (como el secado en *spray* o la liofilización) suelen ser pasos complementarios de la extrusión y emulsión, ya que conducen a una disminución en el tamaño de partícula y el polvo obtenido puede manejarse con mucha facilidad. Estos procesos de deshidratación también pueden emplearse directamente sobre los cultivos bacterianos o en matrices de alimentos, sin los procesos previos de extrusión o emulsión. Sin embargo, esta estrategia puede funcionar en ciertos casos, pero no en otros, ya que algunas bacterias son más susceptibles al daño o la muerte durante el proceso de deshidratación (Cook *et al.*, 2012).

Como se explicó en el párrafo anterior, las técnicas de deshidratación pueden considerarse como pasos complementarios a la encapsulación, y ser utilizadas como técnicas de preservación luego de encapsular bacterias probióticas. Es por ello que el proceso de microencapsulación será dividido en dos fases:

- i. Proceso de encapsulación
- ii. Proceso de preservación.

3.1.1. Proceso de encapsulación

Dependiendo del método utilizado se dividen en: **método de extrusión o de gotas** y el **método de emulsión o sistema de dos fases**. Ambos métodos de encapsulación han permitido aumentar la viabilidad de bacterias probióticas en más del 80% (Solanki *et al.*, 2013).

La técnica de **extrusión** incluye varios métodos, de los cuales la gelificación iónica es muy utilizado para encapsular probióticos (Etchepare *et al.*, 2015). El método 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 un hidrocoloide (*e.g.*, pectina, alginato) y la suspensión se hace gotear sobre una sal (*e.g.*, CaCl₂) que permite la gelificación (Wahab *et al.*, 1997).

La **emulsificación** se define como un proceso de dispersión de un líquido en un segundo líquido inmiscible (Goodarzi y Zendejboudi, 2019). Si se incluye el material a encapsular en el primer líquido, éste se puede encapsular aplicando esta metodología (de Vos, *et al.*, 2010). Cuando se encapsulan microorganismos mediante emulsificación, los pasos a seguir son los siguientes: un pequeño volumen de una solución polimérica con bacterias en suspensión (fase dispersa) es adicionado a un volumen mayor de aceite vegetal (fase continua), que puede ser aceite de soja, girasol o maíz. Luego, la mezcla es homogeneizada hasta formar una emulsión de agua en aceite (Groboillot *et al.*, 1993).

3.1.2. Procesos de preservación

La deshidratación de probióticos mejora su estabilidad durante el almacenamiento prolongado (Perdana *et al.*, 2013). Sin embargo, el proceso de secado puede causar deterioro de las cápsulas, liberación de algunas bacterias y pérdida de viabilidad.

El objetivo general de estabilizar biomoléculas (o biomateriales o bacterias) es obtener productos que puedan ser conservados a largo plazo, manteniendo la actividad que tenían antes de la preservación. En general, los procesos de conservación permiten reducir la actividad de agua del material a preservar, inhibiendo las reacciones químicas y biológicas responsables de su degradación (Lodato *et al.*, 1999; Jagannath *et al.*, 2010).

Los métodos de preservación de microorganismos más utilizados son la liofilización y la congelación. Sin embargo, debido a los altos costos de producción y almacenamiento, se han estudiado métodos alternativos, tales como el secado por atomización (secado *spray*). Si bien este método es ampliamente utilizado para la obtención de alimentos deshidratados, la utilización de altas temperaturas para eliminar el agua produce no sólo estrés hídrico, sino también estrés térmico, lo cual disminuye su eficiencia en el mantenimiento de la viabilidad bacteriana (Coulibaly *et al.*, 2010).

3.1.2.1. Congelación. Las velocidades de congelación y descongelación son determinantes para garantizar la actividad y viabilidad celular luego de dichos procesos. La congelación rápida acompañada de una rápida descongelación es una estrategia favorable para la supervivencia celular (Thammavongs *et al.*, 2004). Las temperaturas más utilizadas son $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cuanto menor es la temperatura de almacenamiento, mayor será la supervivencia de las bacterias (Fonseca *et al.*, 2001). La congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido ($-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) constituye un método que permite obtener una mejor actividad y viabilidad celular (Thunell *et al.*, 1984; Zheng y Sun, 2006). Sin embargo, es una técnica muy cara y en general, la infraestructura no está preparada para su implementación a escala de laboratorio ni a escala industrial.

3.1.2.2. Liofilización. La liofilización es un método reconocido hace mucho tiempo para el almacenamiento y preservación de bacterias lácticas y probióticos (Perry, 1998; Carvalho *et al.*, 2004; Gautier *et al.*, 2013; Saarela *et al.*, 2005; Jagannath *et al.*, 2010). En el proceso de liofilización, el agua es removida por sublimación del hielo de la muestra congelada. De esta manera, se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado líquido. El proceso consta de tres etapas: congelación, sublimación y desorción (Perry, 1998). Luego de estas etapas, el material es obtenido como un concentrado en polvo (**Figura 7**).

La resistencia bacteriana a la liofilización es cepa dependiente. Así, las distintas especies y cepas pueden exhibir un comportamiento diferente (variabilidad inter cepa) durante la liofilización y subsecuente almacenamiento, aun en condiciones comparables (Carvalho *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2003). Otros factores, tales como 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 bacteriana durante la liofilización. La temperatura de almacenamiento es otro parámetro crítico para la conservación de bacterias liofilizadas (Zhao y Zhang, 2005). Los polvos liofilizados pueden ser almacenados bajo vacío, mantenidos en actividad de agua controlada y en la oscuridad.

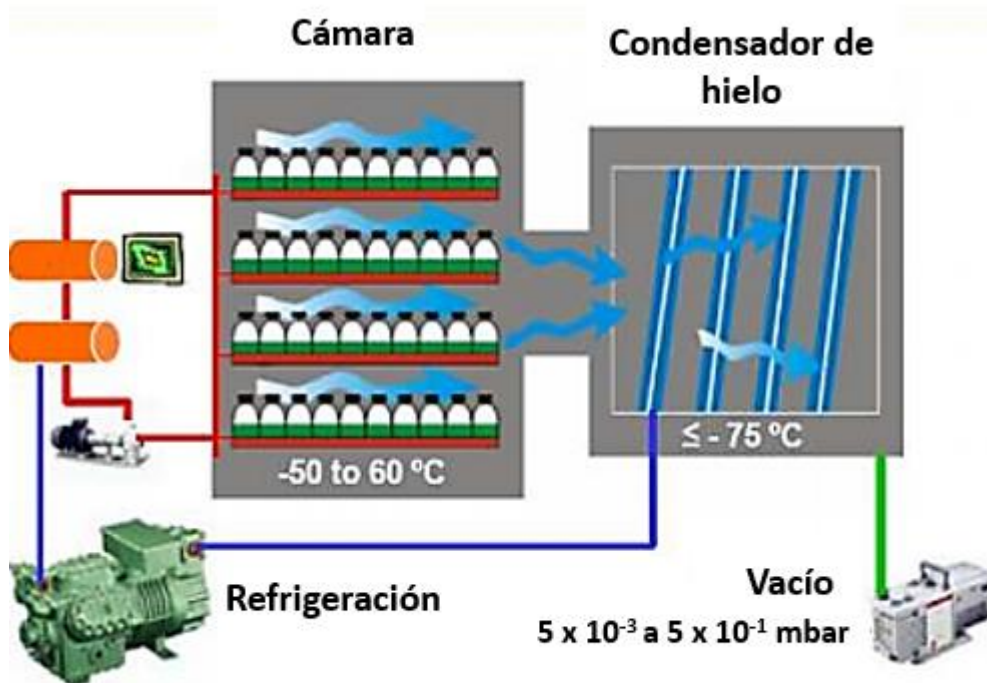


Figura 7. Representación esquemática de un equipo de liofilización

La liofilización presenta numerosas ventajas:

- La temperatura de trabajo es muy baja (el producto se congela a -80 °C) por lo que las estructuras termolábiles no se alteran,
- La ausencia de oxígeno durante el proceso evita la oxidación de biomoléculas bacterianas,
- No hay agua libre, por lo tanto no hay riesgo de crecimiento microbiano,
- La humedad residual es baja,
- Los productos suelen ser estables durante el almacenamiento por períodos prolongados,
- Los productos liofilizados ocupan poco volumen en comparación con los congelados, lo que representa una ventaja en términos de transporte y almacenamiento.

Para garantizar la máxima viabilidad y actividad de los cultivos liofilizados deben optimizarse las condiciones de humedad y temperatura de almacenamiento y transporte (Coulibaly *et al.*, 2010).

3.1.2.3. Secado en *spray*. El secado *spray* es un proceso único en el que las partículas se forman al mismo tiempo que se secan (Barbosa Canovas *et al.*, 1996). En dicho proceso, los productos deshidratados en polvo se producen a partir de una suspensión líquida, atomizando el producto húmedo a alta velocidad y dirigiendo el rociado de gotas hacia un flujo de aire caliente. Las pequeñas gotas atomizadas tienen una superficie específica muy grande en forma de millones de gotitas de tamaño micrométrico (10 – 200 μm), lo que resulta en un tiempo de secado muy corto cuando se exponen al aire caliente en una cámara de secado (Morgan *et al.*, 2006; Santivarangkna *et al.*, 2007). Las enzimas deshidratadas, detergentes, extractos de café y proteínas aisladas son ejemplos de productos generados por secado por pulverización. Este proceso también se ha utilizado en la producción de cultivos de bacterias lácticas y bacterias probióticas deshidratadas (Barbosa Canovas *et al.*, 1996; Riveros *et al.*, 2009).

El proceso de secado *spray* se puede dividir en varias etapas (**Figura 8**). En primer lugar, la suspensión líquida es bombeada hacia una tobera de dos fluidos (2), en donde se atomiza al entrar en contacto con un gas a alta presión (1). La suspensión atomizada en pequeñas gotas entra en contacto con un gas (aire) previamente calentado (3) en la cámara de secado (4). Aquí, se pueden aplicar tres patrones de flujo de pulverización dependiendo de la dirección en la que el aire caliente y el líquido entran en la cámara de secado: co-corriente, contracorriente y flujo mixto. Como los probióticos son organismos sensibles al calor, es importante aplicar la configuración de co-corriente. En este patrón, las gotas más húmedas entran en contacto con la temperatura más alta y las partículas más secas con la más baja temperatura, minimizando así el riesgo de daño por calor a los microorganismos. Luego, las gotas se secan y se forman las partículas secas. Finalmente, las partículas sólidas se separan del aire de secado. En general, las partículas gruesas y pesadas se separan en la base de la cámara de secado por fuerza gravitacional (5) y las partículas finas se separan usando ciclones (6) y filtros de bolsa (7). El polvo recogido en el recipiente recolector es un polvo listo para usar (Masters, 1985).

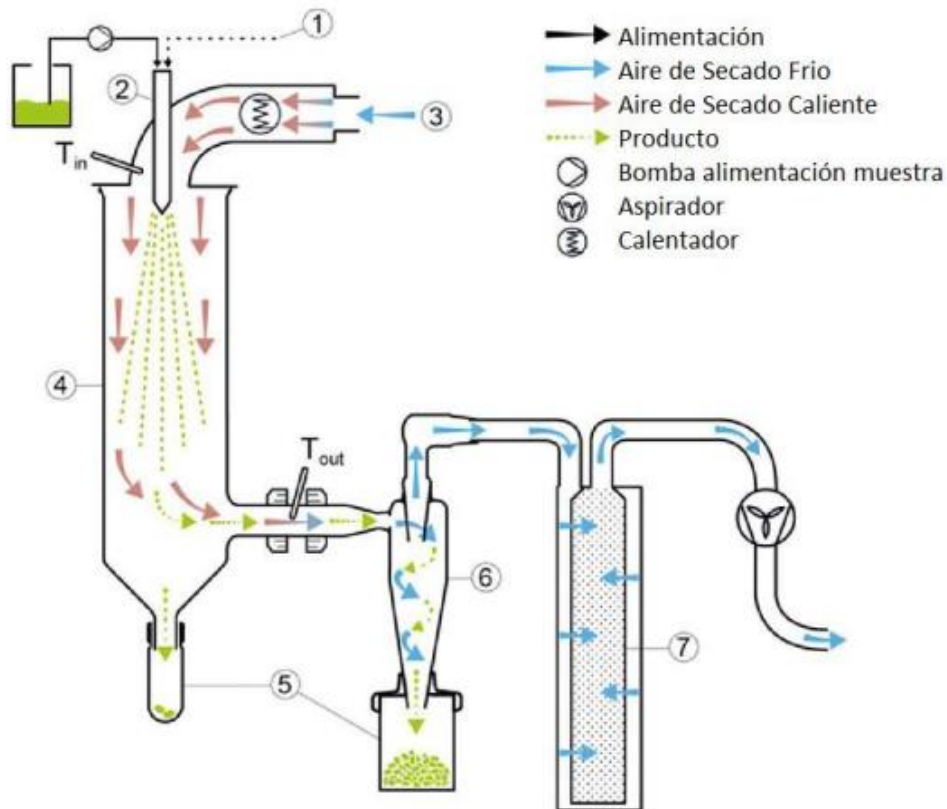


Figura 8: Esquema de funcionamiento de un secador spray de funcionamiento co-corriente. Adaptado de Buchi Application Note 248/2017 (2017)

El secado en *spray* se caracteriza por ser una técnica rápida, altamente reproducible, apropiada para aplicaciones industriales y cuyos costos de procesamiento son relativamente bajos, permitiendo la deshidratación de grandes cantidades de volúmenes de cultivos en tiempos relativamente cortos (Broeckx *et al.*, 2016). Estas ventajas hacen que el secado en *spray* sea una tecnología interesante para la producción de *starters* a gran escala. Además, como es el proceso empleado para la producción de leche en polvo, existe una alta disponibilidad de secadores en *spray* en el mercado de la industria alimentaria, que también podrían usarse para otros fines más allá de la producción de leche en polvo.

La preservación de cultivos por esta técnica tiene la ventaja de permitir una producción de grandes cantidades de cultivos deshidratados a bajo costo, los cuales pueden ser almacenados durante períodos prolongados de manera estable (Teixeira *et al.*, 1995; Gardiner *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2004). Sin embargo, la principal limitación del secado en *spray* es la baja supervivencia de los microorganismos (Gardiner *et al.*, 2000; Desmond *et al.*, 2002; Corcoran *et al.*, 2004; de Vos *et al.*, 2010), debido a la

exposición a diferentes tipos de estrés, tales como estrés térmico, deshidratación, presión osmótica, estrés oxidativo. La tolerancia a dichos factores es cepa y especie dependiente, por lo cual el ajuste de las condiciones de secado (temperatura de entrada y salida del aire, presión de atomización) y el medio de suspensión del microorganismo (matriz) resulta importante para optimizar la recuperación de bacterias lácticas secadas en *spray*.

Objetivos Generales

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos en esta sección, los objetivos generales de este trabajo de tesis son:

- Utilizar los residuos de la soja (okara) para el crecimiento y la protección de bacterias lácticas probióticas (Capítulo I);
- Utilizar diferentes métodos de encapsulación para proteger bacterias lácticas probióticas aprovechando el aceite de okara obtenido durante el desengrasado (Capítulo II).
- Analizar el ciclo de vida (impacto ambiental) a escala de laboratorio, generado desde el procesamiento del okara, su uso como medio de cultivo, su preservación y almacenamiento (Capítulo III).

Aprovechamiento del okara
como medio de cultivo y matriz
para el transporte y protección
de *Lactobacillus plantarum*
CIDCA 83114

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I.1. Alimentos fermentados

Los alimentos fermentados han sido consumido a nivel mundial durante siglos, formando parte de las tradiciones alimentarias regionales. Se trata de productos que enriquecen la dieta humana, ya que contienen una gran variedad de nutrientes y aportan textura, aroma y sabor a los alimentos. El proceso de fermentación mejora el contenido general o la disponibilidad de aminoácidos, vitaminas, perfiles minerales y potencialidades terapéuticas que ejercen efectos beneficiosos de manera directa sobre la salud del consumidor (Steinkraus, 2002).

Desde un punto de vista bioquímico, la fermentación es el proceso por el cual los microorganismos (hongos, bacterias y levaduras) usan diferentes compuestos orgánicos en condiciones anaeróbicas como fuentes de energía, generando diversos productos metabólicos con relevancia tecnológica y/o fisiológica. Los microorganismos más utilizados para fermentar alimentos son las bacterias lácticas (Mota de Carvalho *et al.*, 2018), y los principales sustratos de fermentación pueden ser de origen animal o vegetal (Tamang *et al.*, 2016). El proceso de fermentación tiene tres propósitos principales: la **conservación de alimentos** y bebidas, la **producción de componentes** nutricionalmente relevantes y la **mejora de su palatabilidad** (sabor, aroma, textura) (Frias *et al.*, 2016).

Con respecto a la **conservación**, las bacterias lácticas utilizadas para la fermentación de alimentos producen ácidos orgánicos y compuestos antimicrobianos (*e.g.*, bacteriocinas) (Molin, 2008), que eliminan sustancias tóxicas e inhiben el desarrollo de microorganismos asociados al deterioro de alimentos (Hammes y Tichaczek, 1994), prolongando así la vida útil del producto (Bourdichon *et al.*, 2012; Gaggia, di Gioia *et al.*, 2011).

Muchos **metabolitos nutricionalmente** relevantes, tales como las vitaminas, son producidos como resultado de la fermentación (van Boekel *et al.*, 2010). Esta capacidad de las bacterias lácticas es particularmente relevante porque ciertas vitaminas se producen exclusivamente como resultado de la fermentación (*e.g.*, provitamina D2, vitaminas B2, B12, B13, grupo de vitamina F, ATP, nucleósidos, coenzimas). En los últimos años se ha informado la presencia de diferentes compuestos bioactivos (Liu *et al.*, 2014), es decir, pequeñas moléculas con una acción biológica, son capaces de

provocar cambios químicos durante los procesos de fermentación (Martins *et al.*, 2011). En este grupo se encuentran los compuestos fenólicos, aminoácidos, ácidos grasos o carbohidratos (Capozzi *et al.*, 2012a; Rodgers, 2008; Rodríguez *et al.*, 2009; Sheih; Xu *et al.*, 2015), que pueden actuar como antioxidantes naturales (Martins *et al.*, 2011). La producción de compuestos bioactivos a partir de productos fermentados depende en gran medida del material de partida, de las cepas utilizadas para la fermentación y de las condiciones ambientales (estacionalidad, región geográfica y condiciones de fermentación) (Nikolopoulou, *et al.*, 2006; Starr, Petersen *et al.*, 2015). Asimismo, el valor nutricional de un determinado producto fermentado también puede ser mejorado como resultado de la eliminación de factores antinutricionales y toxinas (Soni y Dey, 2014).

En relación a la **mejora de su palatabilidad**, algunos microorganismos producen metabolitos (en particular compuestos volátiles) que mejoran las propiedades organolépticas (Marilley y Casey, 2004). En muchos casos, la fermentación es necesaria para obtener un alimento de interés o con las características propias del producto, tal como ocurre en los productos derivados de la soja (tofu, miso), yogures, quesos, cerveza o vino. En otros productos, como el chocolate, el café, las hojas de té o los panes de masa fermentada, la fermentación es sólo un paso durante la elaboración. Independientemente del proceso en particular, la fermentación es un proceso importante para generar sabores y aromas.

I.2. Matrices alimentarias como vehículos de probióticos

Las matrices alimentarias actúan como vehículos adecuados de bacterias lácticas y probióticos. La incorporación de los microorganismos en la matriz y el mantenimiento de su viabilidad durante su formulación y almacenamiento plantea importantes desafíos tecnológicos (Dodoo *et al.*, 2017; Wilkinson, 2018, Terpou *et al.*, 2019). En este sentido, existen factores inherentes a la matriz, al procesamiento y al probiótico que deben ser tenidos en cuenta a la hora de incorporar los microorganismos.

La matriz alimentaria y los procesos a los cuales se ve expuesta juegan un rol importante en la supervivencia de los probióticos incluidos en ella. Los probióticos deben superar diferentes etapas (formulación y procesamiento del alimento) hasta lograr el producto final deseado. Por otra parte, la matriz alimentaria debe proveer un

ambiente adecuado para mantener la viabilidad de los probióticos en concentraciones que les permitan brindar sus efectos beneficiosos sobre la salud del huésped (concentraciones superiores a 10^6 - 10^7 unidades formadoras de colonias por gramo de alimento (UFC/g) al momento del consumo (FAO/OMS, 2002).

La supervivencia de los probióticos durante el almacenamiento de alimentos puede verse afectada positiva o negativamente por la matriz alimentaria, que actúa como vehículo (Sanders y Marco 2010). Además, la adición de probióticos puede alterar el sabor y el aroma del producto alimenticio final debido a la producción de diferentes metabolitos (*e.g.*, ácidos orgánicos, amidas), que durante la fermentación pueden otorgarle características propias del producto, pero que durante el almacenamiento prolongado puede alterarlo generando sabores no deseados (Stanton et al., 2003; Mohammadi *et al.*, 2011; Terpou et al., 2019). Por lo tanto, es esencial que la incorporación de un cultivo probiótico no afecte negativamente las características sensoriales y de calidad del producto (Mohammadi *et al.*, 2011; Stanton *et al.*, 2003).

Existen nueve parámetros relevantes de la matriz alimentaria, que actúan directa o indirectamente sobre la protección y el transporte de probióticos: pH, temperatura de almacenamiento, actividad de agua, capacidad *buffer* de la matriz, estructura física de los alimentos, estrés oxidativo, contenido nutrientes, incorporación de aditivos y la exposición a condiciones gastro-intestinales (**Figura I.1**).

El **pH** de la matriz es un factor que puede afectar la viabilidad bacteriana. La acidez es uno de los principales factores que afectan la supervivencia de los probióticos durante el almacenamiento (Borges *et al.*, 2016; Charnchai *et al.*, 2016; Coman *et al.*, 2012; Vinderola *et al.*, 2012). Un valor de pH muy bajo aumenta la concentración de ácidos orgánicos no disociados en productos fermentados, lo que aumenta el efecto bactericida de estos compuestos (Mortazavian *et al.*, 2012, Tripathi y Giri 2014).

La **temperatura de almacenamiento** tiene un efecto directo sobre la viabilidad bacteriana. Temperaturas elevadas de almacenamiento conducen a un aumento de la actividad metabólica bacteriana, lo cual afecta su supervivencia. Por lo tanto, cuanto menor sea la temperatura de almacenamiento, mayor será la viabilidad bacteriana (Savini *et al.*, 2010).

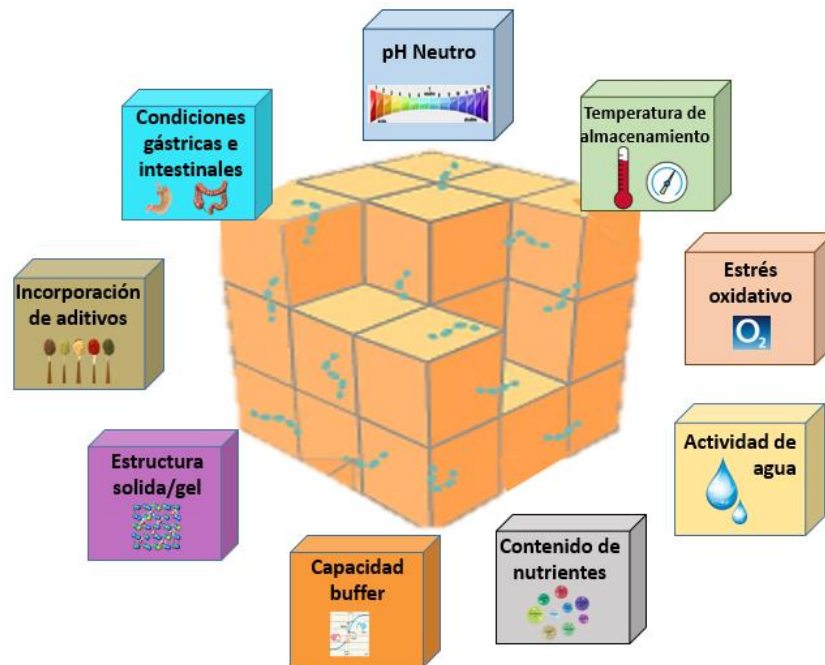


Figura I.1. Modelo de matriz alimenticia ideal para la protección, transporte y liberación efectiva de bacterias probióticas durante la formulación de alimentos funcionales.

El **estrés oxidativo** puede afectar negativamente la viabilidad y funcionalidad de los probióticos. Los lactobacilos suelen ser más tolerantes al oxígeno que las bifidobacterias (Mortazavian *et al.*, 2012).

La **actividad de agua (a_w)** es otro factor que puede afectar la viabilidad de los probióticos. La a_w debe permanecer baja durante el almacenamiento para mantener la viabilidad de los probióticos deshidratados y metabólicamente inactivos, estables, durante el almacenamiento a largo plazo (Vesterlund *et al.*, 2012; Yeo *et al.*, 2011; Tripathi y Giri 2014).

El **contenido y la cantidad de nutrientes** en las matrices es otro factor a considerar en relación a la viabilidad de probióticos contenidos en matrices alimentarias. Por su parte, se ha sugerido que la relación lípido:azúcar tiene una capacidad protectora de los probióticos contenidos en alimentos (Vinderola *et al.*, 2000; Deepika *et al.*, 2011; Klu *et al.*, 2012, 2014). Un alto contenido de fibra también puede estimular la adhesión de los microorganismos a la matriz alimentaria, lo que aumenta su supervivencia durante el almacenamiento (Gomand *et al.*, 2019).

Una adecuada **capacidad buffer** por parte de la matriz contribuye a proteger a los microorganismos durante el procesamiento y almacenamiento del alimento,

reduciendo el impacto de factores asociados a la temperatura (Saxelin *et al.*, 2010; Guerin *et al.*, 2017).

La **naturaleza física de la matriz** (sólido, gel, emulsión, líquido) juega un papel importante porque puede proteger las bacterias probióticas de un entorno eventualmente desfavorable. Esto adquiere especial relevancia en el caso del queso (Castro *et al.*, 2015, Karimi *et al.*, 2011), donde ha sido informado que las matrices sólidas y los geles se unen física y químicamente a factores perjudiciales (iones hidrógeno o ácidos orgánicos), reduciendo la exposición de las bacterias a los mismos (Karimi *et al.*, 2011, Mohammadi *et al.*, 2011; Mortazavian *et al.*, 2012, Ranadheera *et al.*, 2010). Además, la retención de los iones hidrógeno por parte de la matriz disminuye la cantidad de ácidos orgánicos no disociados capaces de atravesar las membranas bacterianas (Russell y Diez-Gonzalez, 1997), lo que resulta en la reducción de su efecto bactericida (Mortazavian *et al.*, 2012). La inmovilización de los microorganismos en dichas matrices limita su exposición a factores perjudiciales durante el almacenamiento, lo que a su vez contribuye a mantener su viabilidad. A su vez, una estructura física sólida puede limitar el acceso de oxígeno durante el almacenamiento (Borges *et al.*, 2016).

La **incorporación de aditivos**, tales como los azúcares (*e.g.*, sacarosa), sales, antimicrobianos, compuestos aromáticos o incluso bacteriocinas, a las matrices alimentarias pueden afectar de diferentes maneras la viabilidad de las bacterias. Los compuestos antimicrobianos y las bacteriocinas pueden provocar efectos negativos sobre la viabilidad de las bacterias probióticas en la matriz alimentaria. Sin embargo, aditivos como los azúcares, tienen un efecto positivo sobre la viabilidad durante el almacenamiento (Kumar y Atreja, 2012; Rastall y Gibson, 2015).

Finalmente, la **exposición al ambiente gastrointestinal** representa un factor adicional que condiciona la viabilidad bacteriana una vez ingerido el alimento. En este sentido, el medio ácido del estómago y la presencia de jugos digestivos (*e.g.*, bilis) pueden tener efectos negativos sobre la viabilidad. Además, la respuesta de los microorganismos a los factores inherentes a la matriz y al procesamiento de los alimentos es cepa dependiente.

Todos estos factores resaltan la necesidad de definir matrices físicamente estables, que proporcionen las condiciones apropiadas para mantener la viabilidad bacteriana durante períodos prolongados (El Hage *et al.*, 2017).

Entre las bacterias lácticas del género *Lactobacillus*, *L. plantarum* CIDCA 83114 (Figura I.2), una cepa aislada de gránulos de kefir, ha demostrado propiedades probióticas y tecnológicas, entre las que pueden mencionarse la inhibición del crecimiento y/o la actividad de *Escherichia coli* O157: H7 y *Salmonella* (Golowczyc *et al.*, 2011b; Kakisu *et al.*, 2013), y la resistencia a procesos térmicos y de deshidratación (Romano *et al.*, 2014; Tavera-Quiroz *et al.*, 2015). Estas propiedades la convierten en una buena candidata para fermentar diferentes matrices alimentarias y determinados subproductos con potencial interés industrial, como el okara, otorgándoles un valor agregado.

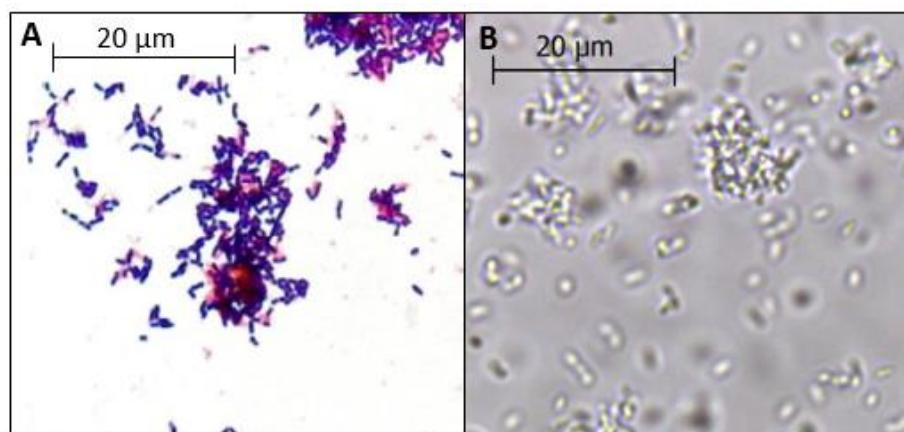


Figura I.2. Microfotografía de *Lactobacillus plantarum*. A. Microscopía de campo claro por tinción Gram. B. Microscopía óptica

I.2.1. Okara como matriz de fermentación

El okara es un subproducto agroindustrial altamente contaminante y susceptible de deterioro (putrefacción). Debido a la gran cantidad de nutrientes fácilmente asimilables por microorganismos, el okara constituye también un excelente sustrato para la fermentación por parte de bacterias de interés industrial.

Teniendo en cuenta el valor nutricional del okara y su elevada capacidad contaminante, se han desarrollado diferentes abordajes para agregar valor a este residuo (Vong y Liu, 2016). Así, el okara se ha utilizado de manera creciente en la formulación de diferentes productos alimenticios (Radočaj y Dimic 2013; Jang *et al.*, 2019).

La fermentación de okara aparece como una estrategia interesante para evitar su deterioro, generando una matriz más estable, factible de ser utilizada como ingrediente

funcional (Quintana *et al.*, 2017; Espinosa-Martos y Ruperez 2009; Vong y Liu 2016). Además, la fermentación del okara desempeña un papel importante en la liberación, transformación y absorción de compuestos bioactivos durante la digestión gastrointestinal (Parada y Aguilera 2007). Por otra parte, la fermentación puede disminuir el contenido de fibra cruda, aumentar el contenido de fibra soluble, proteínas, aminoácidos e isoflavonas y/o hidrolizar el ácido fítico (factor antinutricional), lo que conduce a una mejora del valor nutricional y de las propiedades de procesamiento del okara (Santos *et al.*, 2018). El okara crudo también ha demostrado tener actividad antioxidante, atribuida a su polisacárido de la pared celular y posiblemente al contenido de proteínas (Mateos-Aparicio *et al.*, 2010). El okara, al igual que la soja, contiene compuestos fenólicos, lo cual lo convierte en una fuente potencial de sustancias bioactivas. Además, contiene isoflavonas de la soja, tales como la genisteína, daidzeína y glicitina, que le confieren actividad antioxidante. La genisteína puede quelar los radicales peroxilo y evitar la peroxidación de lípidos que causan la aterosclerosis (Singh *et al.*, 2014).

I.2.2. Okara como vehículo de antioxidantes

Los antioxidantes constituyen un extenso grupo de compuestos químicos con capacidad de inhibir o retrasar procesos de oxidación. Los antioxidantes pueden actuar en la secuencia de reacciones del proceso de oxidación lipídica a través de diferentes mecanismos:

- a) disminuyendo la concentración de oxígeno;
- b) interceptando al oxígeno singulete;
- c) atrapando radicales libres tales como los radicales hidroxilo (OH^\bullet);
- d) por unión con metales (agentes prooxidantes);
- e) favoreciendo la descomposición de productos primarios a compuestos no radicalarios;
- f) por interrupción de la cadena de iniciación o propagación transfiriendo átomos de hidrógeno a los radicales lipídicos (L^\bullet) y peroxilo (LOO^\bullet) (Guiotto *et al.*, 2014; Pokorný *et al.*, 2001; Caroch y Ferreira, 2013; Lobo *et al.*, 2010; Alam *et al.*, 2013).

Desde un punto de vista tecnológico, los antioxidantes son utilizados no sólo como ingredientes funcionales sino también para aumentar la vida útil de los productos

alimenticios. La oxidación de los lípidos es la forma más importante de deterioro de los alimentos después de las alteraciones producidas por microorganismos. Esta reacción produce cambios organolépticos (olor, sabor, color y textura), nutricionales (degradación de algunas vitaminas y de ácidos grasos poliinsaturados) y pérdida de actividad funcional (Griffiths *et al.*, 2016). Además, los productos formados en la oxidación pueden llegar a ser nocivos para la salud (Lobo *et al.*, 2010; Pizzino *et al.*, 2017).

El okara fermentado permite la liberación de compuestos bioactivos que podrían ser extraídos para un uso posterior como ingredientes funcionales. Se trata de una opción adecuada, ya que los compuestos extraídos se pueden considerar como "naturales" (dependiendo del método de extracción utilizado). Sin embargo, el okara residual continuará siendo un subproducto contaminante. Por esta razón, el uso del okara fermentado (completo) como alimento constituye la aplicación más ecológica y, posiblemente, más económica.

Objetivos específicos

Considerando que el okara es un subproducto en la elaboración de bebidas de soja que posee un alto valor nutricional, se plantearon como objetivos específicos de este capítulo:

- Caracterizar la composición del okara entero y desengrasado.
- Utilizar el okara entero y desengrasado como medio de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114.
- Evaluar el efecto protector del okara entero y desengrasado sobre *L. plantarum* CIDCA 83114 a los procesos de deshidratación y su almacenamiento.
- Evaluar propiedades antioxidantes del okara entero y fermentado con *L. plantarum* CIDCA 83114.

I.2. MATERIALES Y MÉTODOS

I.2.1. Okara: conservación y caracterización

El okara fue donado por la Empresa Soyana S. H. (San Martín, Argentina). Una vez recibido, se centrifugó cinco veces durante 15 minutos a 10000 g para eliminar el exceso de agua. El sedimento sólido se colocó en bandejas plásticas, se congeló a -80°C durante 48 horas y se liofilizó en un equipo Heto FD4 (Heto Lab Equipment, Dinamarca) durante 48 horas (temperatura del condensador: -50°C; presión de la cámara: 0.04 mbar). El okara deshidratado fue conservado a 4°C hasta el momento de ser utilizado.

I.2.2. Composición centesimal

I.2.2.1. Humedad

El contenido de agua del okara deshidratado se determinó calculando la pérdida de peso luego de secar en horno de vacío a 70°C hasta peso constante (AOAC, 1980). La determinación se realizó por triplicado. La composición centesimal se expresó en 100 g de base seca.

I.2.2.2. Proteínas

La concentración de proteínas totales se determinó mediante el método Kjeldhal (AOAC 1995) utilizando el factor de conversión de 6.25 g de proteína/g de nitrógeno. La determinación se realizó por triplicado. El % de proteínas se calculó como:

$$\% \text{ Proteínas (P)} = ((\text{Vol}_M - \text{Vol}_{\text{Bco}}) \times N_{\text{H}_2\text{SO}_4} \times 0.014 \times F_{\text{Prot}} / m) \times 100 \quad \text{Eq. I.1}$$

donde P, es el contenido de proteínas; Vol_M , el volumen de la muestra; Vol_{Bco} , el volumen del blanco; $N_{\text{H}_2\text{SO}_4}$, normalidad del ácido sulfúrico utilizado en la titulación; F_{Prot} , factor de proteína; m, la masa en gramos de la muestra.

I.2.2.3. Lípidos

La determinación del contenido de lípidos se realizó por extracción directa de los mismos, mediante el método de Soxhlet (AOAC, 1990). Para ello, la muestra se extrajo con una mezcla de éter etílico/éter de petróleo, y se determinó gravimétricamente el peso del extracto seco, previa eliminación de los solventes. El ensayo se realizó por triplicado. El porcentaje de lípidos se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ lípidos} = (m_2 - m_1 / m) \times 100 \quad \text{Eq. I.2}$$

donde: m_2 es la masa en gramos del balón con lípidos después del secado (en gramos), m_1 , la masa del balón vacío (en gramos), y m , la masa de la muestra (en gramos).

I.2.2.4. Cenizas

La determinación de cenizas se realizó gravimétricamente por calcinación total de las muestras de okara en mufla a 550 °C, hasta obtener cenizas blancas (AOAC, 1990). La determinación se realizó por triplicado, de acuerdo a:

$$\text{Ceniza (C)} = C_{rM} - C_r \quad \text{Eq. I.3}$$

donde C , es el contenido de ceniza en gramos; C_{rM} , la masa en gramos de muestra calcinada con celite; C_r , gramos de celite.

NOTA: el celite es un material que se utiliza para la filtración de las muestras. Se deposita una cantidad de celite que cubra la superficie de los filtros, actuando como una capa que evita que las muestras deterioren la tela de los filtros.

I.2.2.5. Determinación de Fibra Total

La fibra total (F_T) se evaluó utilizando el *kit* Megazyme K-ACHDF 11/08 (Megazyme International Ireland Limited, Bray Irlanda), de acuerdo al procedimiento explicado por el fabricante (McCleary, 2007). Para ello, se pesó por duplicado 1 gramo de muestra, y se le adicionaron 50 mL de buffer fosfato (0.08 M), pH 6. Luego, se agregó 50 μ L de solución de α -amilasa termoestable, se incubó en baño de agua a 100 °C durante 30 minutos y se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 0.275 M. Luego se agregaron 100 μ L de solución de proteasa y se incubó en baño de agua a 60 °C durante 30 minutos con agitación constante. Las muestras fueron retiradas del baño, enfriadas a temperatura ambiente y llevadas a pH 4.5 con HCl 0.325 M. Se adicionaron 200 μ L de amiloglucosidasa, y se incubó en baño de agua a 60 °C durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se agregó etanol 96° sobre las muestras, dejándolas 1 hora a 25 °C para favorecer la precipitación de la fibra.

Finalmente se filtraron las muestras sobre crisoles con celite previamente pesados y conectados a una bomba de vacío. Se usó etanol al 78% v/v y 96% v/v, y acetona para lavar las muestras. Una vez filtradas, las muestras se colocaron en estufa a 105 °C

durante toda la noche. Al día siguiente, se pesaron los crisoles con las muestras secas y se registraron los valores. La fibra total se calculó como:

$$F_T = M - P - C \quad \text{Eq. I.4}$$

donde F_T es la fibra total, M , la muestra en estudio en gramos, P , la concentración de proteínas en gramos, determinada en el ítem I.2.2.2, y C , el contenido de cenizas en gramos, determinado en I.2.2.4.

NOTA: Todas las técnicas arriba mencionadas fueron también utilizadas para determinar la composición centesimal del okara desengrasado, es decir, luego de extraer los lípidos con dietil éter (equipo Soxhlet) (sección I.2.2.3).

I.2.3. Espectroscopía de Infrarrojo por Transformadas de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR del okara liofilizado y okara desengrasado se registraron en la región de 4000–500 cm^{-1} en pastillas de KBr, preparadas en una relación de okara:KBr de 1:200. Se realizaron 64 barridos espectrales, con una resolución de 4 cm^{-1} , en un espectrómetro Thermo Nicolet iS10 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

I.2.4. Microorganismos utilizados

En el presente capítulo se utilizó *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 aislada de gránulos de kefir (Garrote *et al.*, 2001).

I.2.5. Medios de cultivo y soluciones buffer

I.2.5.1. Caldo MRS (de Man, Rogosa and Sharpe, 1960)

Composición	g/litro
- Peptona universal	10.0
- Extracto de carne	5.0
- Extracto de levadura	5.0
- D(+) glucosa	20.0
- Fosfato dipotásico	2.0
- Tween®80	1.0
- Hidrogencitrato diamónico	2.0

- Acetato de sodio 5.0
- Sulfato de magnesio 0.05

pH= 6.5 ± 0.1

I.2.5.2. Okara entero y okara desengrasado

El okara liofilizado, entero y desengrasado, obtenido en la sección I.2.1, fue triturado hasta lograr un aspecto similar al de una harina. Luego se pesó y resuspendió en agua destilada al 5% p/v. Las suspensiones se homogenizaron en un homogenizador Ultra Turrax T25 (IKA, Staufen im Breisgau, Alemania) durante 5 minutos a 12000 g y se autoclavaron durante 15 minutos a 121 °C, obteniendo el medio listo para ser inoculado.

I.2.5.3. Buffer fosfato salino (PBS)

Composición	g/litro
- NaCl	8.02
- KCl	0.23
- Na ₂ HPO ₄	1.17
- KH ₂ PO ₄	0.20

pH= 7.4 ± 0.2

I.2.6. Condiciones de cultivo y cinética de crecimiento

La cepa de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, perteneciente al cepario del CIDCA [conservada a -80°C en leche descremada (Difco, USA)], fue reactivada durante 24 horas en caldo MRS (de Man *et al.*, 1960) a 37 °C en aerobiosis. Luego se hizo un segundo pasaje por medio fresco (concentración del inóculo 1% v/v en caldo MRS e incubación en las mismas condiciones) y posteriormente se inocularon 100 mL de okara entero y desengrasado (concentración de inóculo 1% v/v), incubando a 37 °C con agitación constante de 150 g. En paralelo, *L. plantarum* CIDCA 83114 fue crecida en caldo MRS en las mismas condiciones (control). Las tres cinéticas de crecimiento fueron monitoreadas por medidas de pH y recuento en placa (agar MRS) cada 1 hora.

Para los recuentos en placa, se realizaron diluciones seriadas (factor de dilución 1:10). Se sembraron 10 µL de cada dilución en agar MRS por duplicado utilizando el método de la gota (Herigstad *et al.*, 2001). Luego de 72 horas de incubación a 37 °C en

aerobiosis, se realizó el recuento de microorganismos viables. Los resultados se expresaron en UFC/mL de suspensión.

I.2.7. Extracción de lípidos bacterianos

Para evaluar el efecto del medio de cultivo en la composición de la membrana bacteriana, la cepa de *L. plantarum* CIDCA 83114 se creció en okara entero y okara desengrasado a 37 °C bajo agitación constante. Una vez alcanzada la fase estacionaria, los cultivos se trataron con EDTA al 2% p/v pH 12 durante 10 minutos, para secuestrar el calcio del okara y solubilizar parcialmente las estructuras insolubles (Holt, 1982). Después del tratamiento con EDTA, los cultivos se centrifugaron, los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos, que contenían los microorganismos, fueron utilizados para la extracción de lípidos. Como controles se usaron microorganismos crecidos en MRS hasta fase estacionaria, cosechados por centrifugación y lavados con PBS.

Los lípidos se extrajeron de acuerdo con el método modificado de Bligh y Dyer (Marinetti, 1993). Para ello, los microorganismos crecidos en okara entero, okara desengrasado y en MRS fueron resuspendidos en cloroformo:metanol:agua (1:2:0.8) (4.75 mL por g de bacteria) durante 12 horas a 4 °C y luego centrifugados a 8000 *g* durante 10 minutos a 10 °C. Los sobrenadantes fueron colectados y sobre los pellets se llevó a cabo una segunda extracción, siguiendo los mismos pasos. Los sobrenadantes provenientes de ambas extracciones fueron juntados y se añadió cloroformo:agua (1:1) (12.5 mL por g de bacteria). La mezcla final se centrifugó a 8000 *g* durante 20 minutos. Luego se separó la fase orgánica y se evaporó a sequedad el cloroformo (Rotavapor R RE 120 - Büchi, Flawil, Suiza). El film de lípidos resultante fue disuelto en cloroformo hasta alcanzar una concentración final de 3 mg/mL. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta 2 semanas en frascos color caramelo.

1.2.8. Caracterización de los ácidos grasos

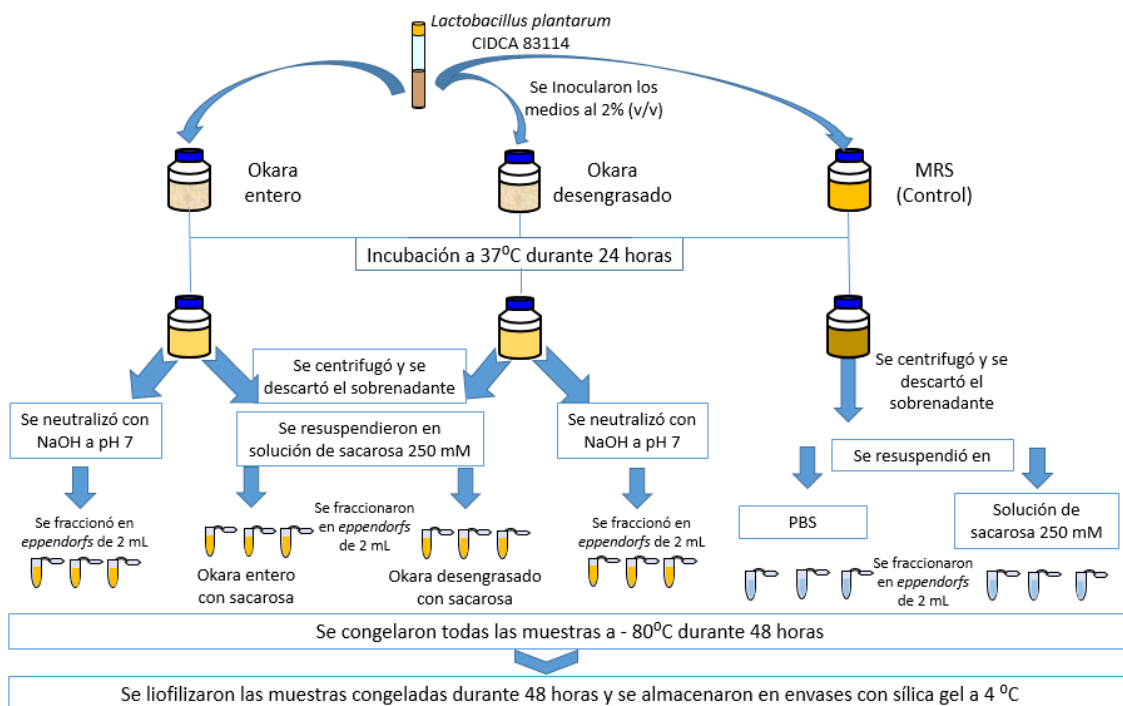
Como primer paso, los lípidos extraídos en la sección I.2.7 fueron convertidos a sus ésteres metilados (derivatización). Para ello, se tomó 1 mL de solución clorofórmica y se evaporó el solvente en corriente de nitrógeno, hasta obtener un film conteniendo 3 mg de lípidos bacterianos. Luego, se agregaron 2 mL de ácido sulfúrico al film de lípidos, se calentó a 60 °C durante 2 horas. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se

extrajeron con 1 mL de cloroformo:agua (2:0.7) y se lavaron dos veces con 0.7 mL de agua destilada. Las muestras se analizaron en un cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro de masa (Shimadzu QP 5050A, Tokio, Japón) utilizando la columna capilar ZB-5 (30 m² 0.25 mm). Las condiciones de análisis fueron: temperatura de inyección 250 °C, temperatura del detector 280 °C y temperatura de la columna fue de 100 °C al inicio y luego se calentó a una velocidad de 6 °C/min hasta 280 °C. La composición de los ácidos grasos se determinó teniendo en cuenta la contribución del área de cada pico en relación al área total. Los resultados se expresaron como % del área total.

I.2.9. Procesos de deshidratación y almacenamiento

I.2.9.1 Liofilización

Se inoculó okara entero y desengrasado con *L. plantarum* CIDCA 83114, a partir de un cultivo en fase estacionaria, con una concentración de inóculo del 1% v/v. Los microorganismos se crecieron a 37 °C hasta alcanzar la fase estacionaria (24 horas de incubación). Se tomó 1 mL de cultivo y se neutralizó con NaOH a pH 7. Luego se pasaron a *ependorfs* de 2 mL en condiciones asépticas y se congelaron a -80°C durante 48 horas. La liofilización se llevó a cabo a -50 °C usando un liofilizador Heto FD4 (Heto Lab Equipment, Dinamarca), durante 48 horas. En paralelo, se trabajó con cultivos en fase estacionaria crecidos en okara entero y desengrasado, se los centrifugó y se descartó el sobrenadante. Los pellets fueron resuspendidos en una solución de sacarosa 250 mM, luego se liofilizaron. A su vez, los microorganismos crecidos en caldo MRS se cosecharon por centrifugación, se neutralizaron y resuspendieron en sacarosa 250 mM o en PBS. El proceso de liofilización se llevó a cabo, tal como se describió para las bacterias crecidas en okara. Los resultados se expresaron como $\log N/N_0$, donde N y N_0 fueron las UFC/mL después y antes del proceso de liofilización, respectivamente (**Esquema I.1**).



Esquema I.1. Proceso de deshidratación de las muestras por liofilización

I.2.9.2. Secado en *spray*

En un experimento paralelo, se neutralizaron 100 mL de cultivo de bacterias crecidas en okara entero y desengrasado hasta fase estacionaria. Las bacterias fueron deshidratadas en un secador *spray* (Büchi B290, Flawil, Suiza) a una temperatura constante de entrada de aire de 180 °C y una temperatura de salida de 65-70 °C. Los microorganismos crecidos en MRS se cosecharon por centrifugación, se neutralizaron y se resuspendieron en PBS antes del secado *spray*. Los resultados se expresaron como $\log N/N_0$, donde N y N_0 fueron las UFC/mL después y antes del secado *spray*, respectivamente.

I.2.9.3. Condiciones de almacenamiento

Luego de liofilizar o secar en *spray*, las muestras se almacenaron a 4 °C durante 90 días, en desecadores que contenían sílica gel. Durante el almacenamiento, se realizaron recuentos en placa de las bacterias liofilizadas y secadas en *spray* a intervalos regulares (de 15 en 15 días) durante 90 días. Para ello, las muestras deshidratadas se rehidrataron en PBS, se homogeneizaron durante 1 minuto en vortex y se mantuvieron a 25 °C

durante 30 minutos y se realizaron recuentos en placa, tal como se explicó en la sección I.2.6.

I.2.10. Modelo matemático

Las grupos de muestras almacenadas se ajustaron mediante regresiones matemáticas lineales y no lineales de acuerdo con las ecuaciones I.5 y I.6, respectivamente:

$$\text{Log } N/N_0 = -kt \quad \text{Ecuación I.5}$$

donde N representa las UFC/mL en un momento determinado del almacenamiento, N_0 , las UFC/mL a tiempo 0, t es el tiempo de almacenamiento (en días) y k es la constante de inactivación bacteriana (en días⁻¹).

La ecuación I.6 se usó para el grupo de muestras que presentaron descensos no lineales de la viabilidad bacteriana:

$$\text{Log } N/N_0 = -Ae^{-k-t} + A \quad \text{Ecuación I.6}$$

donde N son las UFC/mL en el tiempo de análisis, N_0 las UFC/mL a tiempo 0, t es el tiempo de almacenamiento (en días) y k es la constante de inactivación bacteriana (en días⁻¹), y A , el valor de $\text{Log } N/N_0$ en la zona donde los valores se mantuvieron constantes.

I.2.11. Determinación de la actividad de agua (a_w)

La a_w de las muestras liofilizadas y secadas en *spray* se determinó utilizando un equipo Aqualab (Aqualab, modelo serie 3TE, EE. UU.). El equipo se calibró utilizando soluciones salinas estándar proporcionadas por el fabricante.

I.2.12. Preparación de muestras para la determinación de antioxidantes

La determinación de antioxidantes se realizó en el Centro de Química de Madeira (CQM), de la Universidad de Madeira, Portugal. Se trabajó con tres muestras diferentes:

granos de soja molidos (harina), okara entero liofilizado y el okara entero fermentado con *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. Las muestras se prepararon de la siguiente manera:

- Se molieron 400 g de grano de soja con un molinillo de café (Coffee Grinder Profi Cook Power 200 w, China) para obtener harina, que se guardó a 4 °C en heladera hasta el momento de ser usada;
- Okara entero liofilizado, tal como se indicó en la sección I.2.1
- El medio de okara entero preparado como se explicó en la sección I.2.5.2 se inoculó al 1% v/v con *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 y se incubó a 37°C con agitación constante de 200 g. Los cultivos en fase estacionaria (24 horas) fueron cosechados por centrifugación a 8000 g durante 10 minutos, se descartaron los sobrenadantes y los pellets se liofilizaron siguiendo el mismo procedimiento que para el okara entero.

I.2.13. Extracción de fitoquímicos

Primera etapa: se trabajó con diferentes mezclas de etanol:agua para conocer con cuál de ellas se lograba la mejor extracción de fitoquímicos. Esta etapa se llevó a cabo sólo sobre okara. Se usaron 4 mezclas: 100% de etanol, etanol:agua 80:20, etanol:agua 50:50 y agua (100% agua). Se hizo un homogenizado de 5 g de okara entero en 200 mL de cada uno de los solventes de extracción, por duplicado. Las muestras se sonicaron (Bandelix Sonorex, Alemania) durante 1 hora a 25 °C (frecuencia 35kHz, potencia 200W) para facilitar la extracción de fitoquímicos. Este paso se realizó dos veces. Al cabo de este tiempo, el etanol se eliminó en rotavapor a 40 °C (Büchi Rotavapor, Flawil, Suiza) para el caso de las mezclas 100% etanol, 80:20 y 50:50. Luego, los extractos líquidos se congelaron a -80 °C y se liofilizaron para eliminar el agua y concentrar los extractos.

Segunda parte: a partir de los resultados anteriores se eligió la mezcla etanol:agua con mejor rendimiento de extracción, y se la utilizó para extraer los fitoquímicos de los granos de soja molidos, el okara entero y okara fermentado, siguiendo el mismo protocolo explicado en el párrafo anterior.

I.2.14. Digestión *in vitro*

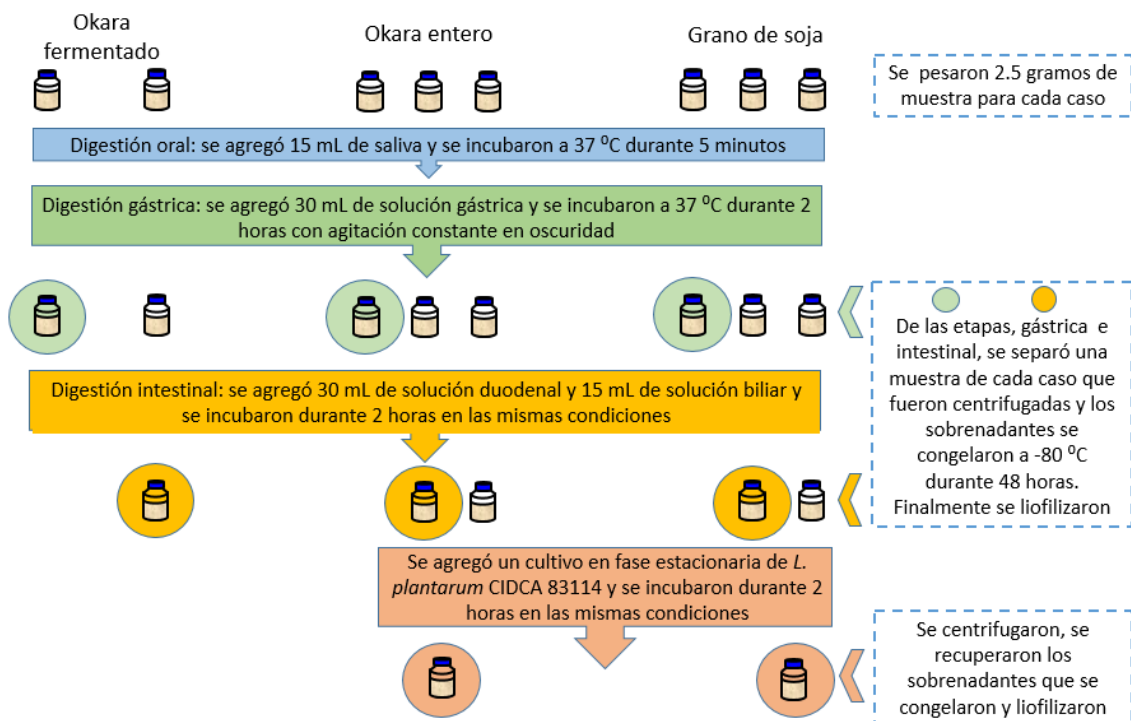
Se utilizó un procedimiento de digestión gastrointestinal *in vitro* para simular el proceso de digestión humana, según Pinto *et al.* (2017) con algunas modificaciones. La composición detallada de los jugos digestivos (saliva, gástrica, intestinal y bilis) se presenta en la **Tabla I.1**. Cada composición imita la composición de los compartimientos gastrointestinales, con sales específicas, enzimas y pH en cada una de las etapas de la digestión. El proceso se dividió en tres etapas: digestión oral, gástrica e intestinal. Se pesaron 2.5 g de muestra (okara fermentado, okara entero y grano de soja), por duplicado, en matraces de 100 mL, se mezclaron con 15 mL de solución de saliva y se incubaron a 37 °C con agitación constante a 190 g durante 5 minutos en oscuridad. Al cabo de ese tiempo, se agregaron 30 mL de solución gástrica, y luego se incubó durante 2 horas a 37 °C con agitación constante en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se tomó uno de los matraces de cada muestra, se centrifugó a 4000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se guardó para liofilizar. Al duplicado de cada una de las muestras se le agregaron 30 mL de solución duodenal y 15 mL de solución biliar para simular las condiciones intestinales, y se incubaron durante 2 horas en las condiciones mencionadas anteriormente. Luego se centrifugaron y se guardó el sobrenadante para liofilizarlo.

En paralelo, sólo para las muestras de okara entero y grano de soja, se repitió el procedimiento como se explicó anteriormente hasta la etapa intestinal y una vez finalizada, se agregó un cultivo ya crecido de la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114 en fase estacionaria ($\sim 1 \times 10^{13}$ UFC/mL), que se incubó durante 2 horas a 37 °C con agitación constante de 190 g en oscuridad. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 4000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se congeló a -80°C para luego liofilizarlo y de esta manera, investigar el efecto de las bacterias sobre los fitoquímicos extraídos durante el pasaje gastrointestinal. Todos los ensayos se hicieron por duplicado. (**Esquema I.2**)

Al final de cada experimento de digestión, las muestras se centrifugaron a 4000 g, 10 minutos y los sobrenadantes se pasaron a tubos Falcon de 50 mL, que fueron congelados a -80°C y posteriormente liofilizados. Una vez finalizado el proceso, las muestras se guardaron en heladera hasta su uso.

Tabla I.1 Composición de las soluciones gastrointestinales simuladas (adaptado de Pinto *et al.*, 2017).

Soluciones	Saliva	Gástrica	Duodenal	Bilis
Agua Destilada	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
NaCl	11.70 mg	0.55 g	1.40 g	1.05 g
KCl	14.90 mg	0.16 g	0.11 g	0.08 g
NaHCO ₃	0.21 g	-	0.68 g	1.16 g
CaCl ₂ .H ₂ O	-	0.08 g	-	-
NaH ₂ PO ₄	-	0.053 g	-	-
KH ₂ PO ₄	-	-	16.06 mg	-
NH ₄ Cl	-	0.061 g	-	-
MgCl ₂	-	-	10.08 mg	-
urea	0.04 g	0.02 g	0.02 g	0.05 g
HCl concentrado	-	1.30 mL	0.03 mL	0.03 mL
Enzimas	0.10 g mucina 0.21 g α-amilasa	0.50 g pepsina 0.60 g mucina	1.80 g pancreatina 0.30 g lipasa	2.40 g sales biliares
pH	6.8 ± 0.2	1.3 ± 0.02	8.1 ± 0.2	8.2 ± 0.2



Esquema I.2. Digestion *in vitro* del okara fermentado, okara entero y granos de soja

I.2.15. Antioxidantes

I.2.15.1 Compuestos fenólicos totales (TPC)

El contenido de TPC se determinó según Pinto *et al.*, (2017) con ligeras modificaciones. Los extractos secos del grano de soja, okara y okara fermentado se disolvieron en etanol, para lograr una concentración final de 100 mg/mL. Se mezclaron 50 μ L de cada solución de extracto con 1.25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (dilución 1:10 con agua destilada) y 1 mL de solución de carbonato de sodio al 7.5% p/v. La mezcla se incubó a 25 °C durante 30 minutos y se leyó la absorbancia a 765 nm (espectrofotómetro Perkin Elmer UV-vis Lambda 2, Alemania). Los datos de TPC se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de extracto seco (mg de GAE/g de extracto seco). Se realizó una curva de calibración con ácido gálico en un rango de concentraciones entre 50 y 600 mg/L.

I.2.15.2. Compuestos flavonoides totales (TFC)

El contenido de flavonoides totales (TFC) se determinó utilizando el método de cloruro de aluminio, según Pinto *et al.* (2017). En un matraz de 5 mL, se agregaron 0.5 mL de solución de extracto (100 mg/mL en etanol), 1.5 mL de metanol, 2.8 mL de agua destilada, 0.1 mL de solución de acetato de potasio (1 M) y 0.1 mL de cloruro de aluminio (10% en metanol). Luego de incubar durante 30 minutos a 25 °C en oscuridad, se leyó la absorbancia a 415 nm (espectrofotómetro Perkin Elmer UV-vis Lambda 2, Alemania). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de rutina (RUE) por gramo de extracto seco (mg de RUE/g de extracto seco). Se realizó una curva de calibración con rutina en un rango de concentraciones entre 10 y 200 mg/L.

I.2.16. Determinación de antioxidantes *in vitro*

I.2.16.1 Ensayo de decoloración del catión radical ABTS (ABTS^{•+})

La actividad antioxidante se evaluó mediante el método de decoloración de la solución ABTS^{•+}. En primer lugar, se hicieron reaccionar 50 mL de solución acuosa de ABTS^{•+} (2 mM) con 200 μ L de solución de persulfato de potasio (70 mM) (Re *et al.*, 1999). Esta mezcla se mantuvo en la oscuridad durante al menos 16 horas a 25 °C y se mantuvo estable en esta forma durante dos días (Re *et al.*, 1999).

La solución ABTS^{•+} se diluyó en PBS hasta una absorbancia inicial de 0.700 ± 0.021 a 734 nm. Esta solución se preparó antes de cada determinación. Para la evaluación de la actividad de secuestro de radicales libres, se agregaron 40 μ L de extracto en solución (100 mg/mL en etanol) a 1.96 mL de solución ABTS^{•+}. Se usó PBS como blanco. Se determinó durante 6 minutos la disminución de absorbancia a 734 nm (espectrofotómetro Perkin Elmer UV-vis Lambda 2, Alemania) (Pinto *et al.*, 2017). Los resultados se expresaron en base a la curva de calibración de Trolox (0.5-0.7 mM), como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de extracto seco (μ mol TE/g de extracto seco).

I.2.16.2. Ensayo de la actividad anti radical (DPPH[•])

Se determinó la decoloración de la solución radical de DPPH de acuerdo a Pinto *et al.* (2017). Para cada determinación, se agregaron 100 μ l de solución de extracto (100 mg/mL en etanol) a 3.5 ml de solución de DPPH[•] (0.06 mM en etanol). La absorbancia se determinó a 516 nm (espectrómetro Perkin Elmer UV – vis Lambda 2, Alemania), después de 30 minutos de reacción en oscuridad a 25 °C, utilizando etanol como blanco. La actividad secuestrante de radicales libres fue expresada como μ mol TE/g de extracto seco, según la curva de calibración de Trolox (0.2-1.2 mM).

I.2.16.3. Actividad superóxido dismutasa (SOD) símil (O₂^{•-})

Los radicales superóxidos aniónicos (O₂^{•-}) fueron generados por el sistema NADH/fenazina metosulfato, según Pinto *et al.* (2017). En una placa de 96 pocillos, se adicionaron 25 μ L de soluciones de extracto (100 mg/mL) y 200 μ L de una solución compuesta por EDTA 0.1 mM, cloruro de tetrazolio nitroblue 62 μ M y NADH 98 μ M. La reacción se inició por adición de 25 μ L de metosulfato de fenazina (33 μ M, que contenía EDTA 0.1 mM) a cada pocillo. Todas las soluciones se prepararon en PBS 0.1 M. Después de 5 minutos, se determinó la absorbancia a 550 nm (lector de placas multilabel Victor3 1420, Perkin-Elmer). Como blanco se utilizó buffer PBS en lugar de solución de metosulfato de fenazina. Los datos se expresaron como μ mol TE/g de extracto curva de calibración de Trolox (4-40 mM).

I.2.17. Análisis estadístico y reproducibilidad de los resultados

Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado utilizando tres cultivos independientes. Los resultados fueron reproducibles independientemente de los cultivos utilizados. Para los datos de crecimientos en medio okara se realizó el análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa estadístico GraphPad Prism versión 5.01 para Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU., 2007). El análisis estadístico de las determinaciones de antioxidantes se realizó con el software SPSS Statistics v.20 (IBM SPSS Statistics para Windows, IBM Corp., USA). La comparación de medias se realizó utilizando el método de Tukey, y si $p < 0.05$, la diferencia se consideró estadísticamente significativa. Se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson (r) para corroborar las relaciones entre TPC y TFC con la actividad antioxidante. La correlación fue significativa para $p < 0.05$.

I.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I.3.1. Caracterización del okara: entero y desengrasado

En una primera etapa se determinó la composición centesimal del okara tanto entero como desengrasado. Los resultados se presentan en la **Tabla I.2**.

Tabla I.2. Composición centesimal del okara liofilizado: entero y desengrasado

Composición centesimal	Okara entero (g/100 g b.s.)	Okara desengrasado (g/100 g b.s.)
Cenizas	1.54 ± 0.67	1.71 ± 0.75
Proteínas	20.90 ± 1.88	23.25 ± 2.09
Lípidos	13.40 ± 1.24	3.67 ± 0.34
Fibra total	54.51 ± 2.43	60.64 ± 2.70
Humedad	9.64 ± 2.30	10.73 ± 2.69

La composición del okara depende principalmente del proceso al que es sometido para la producción de leche de soja o tofu (temperaturas, tiempos de cocción, si la producción se realiza por el método chino o por el japonés), además de la humedad residual de la muestra y de las semillas de soja utilizadas (Redondo-Cuenca *et al.*, 2008; Mateos-Aparicio *et al.*, 2010). Esta dependencia explica eventuales variaciones en las composiciones informadas por diferentes autores. La composición centesimal del okara entero informada en la **Tabla I.2** fue comparable con la presentada por otros autores (Li *et al.*, 2012; Vong y Liu, 2016). Como era esperable, el okara desengrasado presentó una drástica disminución en la concentración de lípidos. Además, se observó un ligero incremento en la contribución de las proteínas y de fibra total como resultado de la disminución de los lípidos.

Para evaluar las alteraciones estructurales del okara luego de la extracción de lípidos, se registraron espectros FTIR, los cuales se presentan en la **Figura I.3**

Los espectros FTIR de okara mostraron diferentes bandas de absorción (**Figura I.3**), comparables a los informados por otros autores (Mateos-Aparicio *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2013). La banda ancha en la región 3500–3300 cm⁻¹ corresponde a los modos vibracionales de estiramiento (*stretching*) de los enlaces O-H y N-H (νOH, νNH) de los grupos hidroxilo y amina presentes en proteínas. Las bandas de absorción en la región 2950-2850 cm⁻¹ pueden ser asignadas a los modos vibracionales asociados a las cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos (νCH₂ y νCH₃ simétricos y asimétricos). La banda a

1745 cm^{-1} corresponde al estiramiento del grupo carbonilo de los ácidos carboxílicos de los lípidos ($\nu\text{C}=\text{O}$). Las bandas a 1650 y 1550 corresponden a los grupos $\text{C}=\text{N}$, $\text{N}-\text{H}$, $\text{C}=\text{O}$ asociados a las estructuras secundarias de proteínas. La región de 1200-900 cm^{-1} corresponde esencialmente a la región *fingerprint* de los azúcares y en ella también absorbe la banda de amida III de las proteínas. En esta región absorben los modos vibracionales δCOH , νCC , νCOH , asociados a los enlaces glicosídicos (Romano *et al.*, 2014).

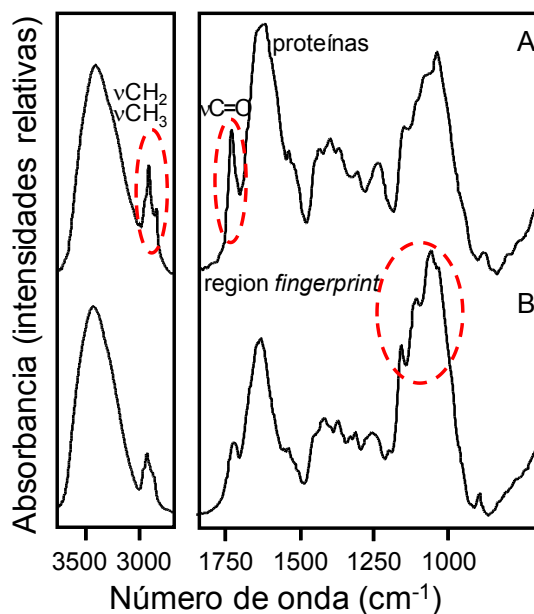


Figura 1.3. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) del okara liofilizado. (A) okara entero; (B) okara desengrasado. Los círculos en líneas de puntos indican las principales diferencias entre ambos espectros.

Las diferencias observadas entre los espectros de okara entero y desengrasado, están relacionadas con las bandas de lípidos y carbohidratos. Para el okara desengrasado se observó una clara disminución en la intensidad de las típicas bandas estrechas de νCH_2 correspondientes a las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos (2931 y 2860 cm^{-1}). Asimismo, la banda de $\nu\text{C}=\text{O}$ a 1745 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento de los grupos carbonilo de los lípidos disminuyó de manera drástica en el okara desengrasado. Otro cambio notable es un aumento de la intensidad relativa de las bandas en la región 1200–900 cm^{-1} (región *fingerprint* de los azúcares). Esto es consistente con la mayor contribución de la fibra en el okara desengrasado, tal como lo refleja la **Tabla 1.2**.

I.3.2. Okara entero y desengrasado como medio de cultivo de *L. plantarum* CIDCA 83114

I.3.2.1. Cinéticas de crecimiento. La Figura I.4 muestra la cinética de crecimiento de *L. plantarum* CIDCA 83114 en okara entero, desengrasado y en medio de cultivo MRS (control), determinada en función de la disminución de pH y de la viabilidad (recuento en placa). No se observaron diferencias significativas para los microorganismos crecidos en los tres medios de cultivo ($p > 0.05$), alcanzando valores máximos de crecimiento de 12.68 ± 0.13 , 12.28 ± 0.07 y 13.32 ± 0.29 log UFC/mL, para el okara entero, desengrasado y el MRS, respectivamente. Esto demuestra que tanto el okara entero como desengrasado son tan adecuados como el MRS para el crecimiento de *L. plantarum* CIDCA 83114.

Varios autores informaron el crecimiento de lactobacilos en diferentes residuos agro-industriales. Así, Vázquez *et al.*, (2011) usaron vísceras de tres pescados diferentes (espada, raya y tiburón) para formular medios de cultivo. En las condiciones presentadas por los autores, las bacterias alcanzaron valores máximos de 12.11 ± 0.23 log UFC/mL y valores finales de pH de 4.39, similares a los valores alcanzados en un medio comercial. Sin embargo, transcurridas las 24 horas de crecimiento se observaron descensos exponenciales de viabilidad, alcanzando valores finales entre 6.35 ± 0.22 a 8.21 ± 0.31 log UFC/mL. Por su parte, Charalampopoulos *et al.*, (2002) utilizaron 4 especies del género *Lactobacillus* (*reuteri*, *acidophilus*, *fermentum* y *plantarum*) para fermentar 3 medios de cultivo diferentes, formulados a partir de cereales: malta, cebada y trigo. Independientemente del medio utilizado, *L. plantarum* presentó los valores máximos de crecimiento respecto del resto de las cepas, alcanzando valores de 10.11 ± 0.18 , 9.43 ± 0.10 y 9.29 ± 0.06 (log UFC/mL) para los medios de malta, cebada y trigo, respectivamente. Además, todos los medios experimentaron descensos de pH de aproximadamente 2 unidades. De la misma manera, el descenso de pH del medio okara entero fue de 6.33 ± 0.06 a 4.07 ± 0.01 , similar al pH del medio control (MRS). Sin embargo, para el caso del okara desengrasado, el comportamiento no fue el mismo, mostrando una disminución de pH de 6.07 ± 0.02 a 4.90 ± 0.05 . Charalampopoulos *et al.*, (2002) informó que el descenso de pH está relacionado con el consumo de azúcar y la producción de ácido láctico, inclusive durante la fase estacionaria, lo cual contribuye a una disminución aún mayor del pH.

Cinética Crecimiento - *L. plantarum* CIDCA 83114

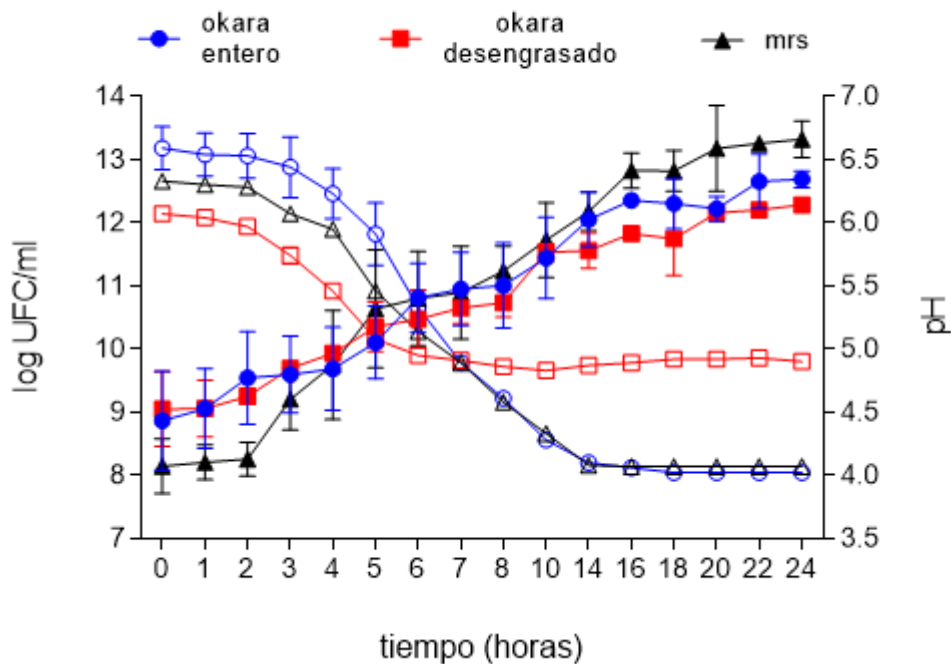


Figura I.4. Cinética de crecimiento de *L. plantarum* CIDCA 83114 en okara entero (círculos azules); okara desengrasado (cuadrados rojos) MRS (control) (triángulos negros). Símbolos llenos: cinética en función de la viabilidad (log UFC/mL); símbolos vacíos: cinética en función del pH.

Sin embargo, otros autores (Espinosa-Martos y Ruperéz, 2009) determinaron que durante el crecimiento de las bacterias, la producción de ácido láctico no es el único metabolito que contribuye a la disminución del pH del medio de cultivo. Microorganismos del género *Bifidobacterium* son capaces de reducir el pH del medio debido a la producción de otros ácidos orgánicos como el acético. La disponibilidad de diferentes nutrientes en el caso del okara desengrasado podría contribuir al menor descenso de pH cuando se crece *L. plantarum* CIDCA 83114.

Debido a la gran disponibilidad del okara, y a que se trata de un subproducto altamente susceptible de descomposición y contaminante para el medioambiente, su utilización como medio de cultivo representa una gran ventaja para la producción de *starters* a gran escala, ya que permitiría reducir sustancialmente los costos de producción. Se ha informado que ciertas cepas de lactobacilos y bifidobacterias fermentan el okara, y por esta razón, se ha propuesto al okara como una fuente potencial de fibra prebiótica (Espinosa-Martos y Ruperéz, 2009). En este sentido, estos autores informaron que dos cepas de *L. acidophilus* y *Bifidobacterium* son capaces de

utilizar los componentes del okara como medio de cultivo dándole un valor agregado a este residuo. De la misma manera, en este capítulo quedó demostrado que el okara es un excelente medio de cultivo para *L. plantarum* CIDCA 83114, permitiendo un crecimiento similar al obtenido en MRS (medio comercial) (**Figura I.4**). Por esta razón, el okara podría considerarse una alternativa rica en fibra para la formulación de nuevos alimentos funcionales con efecto prebiótico.

I.3.2.2. Efecto de la composición de ácidos grasos a partir del medio de crecimiento. La composición de los medios de cultivo determina fuertemente la composición de las membranas lipídicas bacterianas (Smittle *et al.*, 1974; Tymczyszyn *et al.*, 2005), y esta última está relacionada con su estabilidad durante los procesos de conservación (Gomez-Zavaglia *et al.*, 2000). En este sentido, existe abundante bibliografía disponible donde se correlaciona la composición del medio de cultivo con la composición de lípidos de bacterias lácticas (Gautier *et al.*, 2013; Hansen *et al.*, 2015a; Hansen *et al.*, 2015b; Zotta *et al.*, 2016; Reitermayer *et al.*, 2018).

Los lípidos bacterianos son importantes para mantener la estructura y propiedades de la membrana. La membrana celular es el primer sitio de daño durante los procesos de deshidratación bacteriana (congelación, liofilización, secado *spray*), por lo que la composición de ácidos grasos es crítica en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular (Smittle *et al.*, 1974; Tymczyszyn *et al.*, 2005, 2007a, 2008). En este sentido, cabe mencionar que la composición de los ácidos grasos de membrana ha sido relacionado con la resistencia de algunas especies de lactobacilos (*L. delbrueckii*) a la congelación (Gomez-Zavaglia *et al.*, 2000; Louesdon *et al.*, 2014). Así, la resistencia a la congelación-descongelación de cepas con elevado contenido de ácidos grasos insaturados (60-70%) disminuye con el aumento de ácidos grasos cíclicos, característicos de bacterias lácticas (cycC19:0), que desempeña un papel en el mantenimiento de la flexibilidad de la membrana celular (Kodicek, 1963). Por el contrario, en cepas con baja concentración de ácidos grasos insaturados (42-49%), la mayor resistencia a la congelación-descongelación está asociada a mayores niveles de ácidos grasos cíclicos.

Teniendo en cuenta la composición del okara, en particular su composición de ácidos grasos, y el efecto de la composición del medio sobre la membrana bacteriana, se determinó la composición de ácidos grasos de los lípidos presentes en el okara, y su

efecto en la composición de lípidos de membrana. Cualitativamente, el okara contiene los mismos ácidos grasos que los granos de soja, esto es, C18:2, C18:1, C16:0, C18:3 (Peñalvo *et al.*, 2004). El análisis cuantitativo reveló la presencia de 54.61% de C18:2, 21.34% de C18:1, 11.57% de C16:0, 7.97% de C18:3. Teniendo en cuenta la relevancia nutricional de los ácidos grasos insaturados, el aceite de okara se puede utilizar para diferentes aplicaciones, tales como la formulación de emulsiones para la protección de bacterias (Quintana *et al.*, 2018), para el transporte de fármacos, con aplicaciones en la industria cosmética (Karasulu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011), en la industria alimenticia para la producción de mantecas, aderezos para ensaladas, etc. (Latheef, 2012). El subproducto remanente de extraer los lípidos, okara desengrasado, fue considerado en este trabajo de tesis.

Considerando el efecto del medio de cultivo sobre la composición de la membrana lipídica y la relevancia de ésta en el comportamiento bacteriano frente a los procesos tecnológicos, la **Tabla I.3** muestra la composición de ácidos grasos de *L. plantarum* CIDCA 83114 crecido en okara entero y desengrasado, y en MRS (control). Los principales ácidos grasos de *L. plantarum* CIDCA 83114 crecido en MRS fueron C16:0, C18:1 y cycC19:0, con una relación de ácidos grasos insaturados/saturados (I/S) de 0.63. El ácido graso cycC19:0 es típico de las membranas de lactobacilos, y su función está estrechamente relacionada con la estabilidad frente a la congelación/descongelación (Smittle *et al.*, 1974; Gómez-Zavaglia *et al.*, 2000). El crecimiento de microorganismos en okara indujo cambios importantes en la composición de los ácidos grasos, principalmente debido al aumento de los ácidos grasos poliinsaturados (C18:2). Además, la contribución de otros ácidos grasos, como C16:1 y cycC19:0, disminuyó considerablemente para las bacterias crecidas en okara (entero y desengrasado), al igual que los ácidos grasos C16:0 y C18:1. Como resultado de estas alteraciones, se observó una inversión en la relación I/S para microorganismos crecidos en okara entero y desengrasado. Además, debido a la elevada contribución de C18:2, la relación poliinsaturados/monoinsaturados (PUFA/MUFA) también aumentó con respecto a los controles crecidos en MRS (**Tabla I.3**). Se ha informado que el crecimiento de bacterias en medios enriquecidos con ácidos grasos insaturados lleva a un aumento en la relación I/S, lo que evita un elevado empaquetamiento de los lípidos, aumentando así la fluidez de membrana (Muller *et al.*, 2011; Hansen *et al.*, 2015a). Hansen *et al.* (2015a)

informaron que la adición de 10 mg/L de C18:2 al medio de cultivo promueve su incorporación a las membranas bacterianas. En función de esta información, se tomaron las siguientes consideraciones:

(i) el okara desengrasado presentó una concentración de lípidos de 3.67 ± 0.34 g/100 g b.s. (**Tabla I.2**),

(ii) las bacterias se crecieron en suspensiones de okara al 5% p/v (Materiales y Métodos sección I.2.5.2) y

(iii) los ácidos grasos de okara contenían 54.61% de C18:2.

A la luz de estas consideraciones, se realizó un cálculo que permitió determinar que los microorganismos crecidos en okara desengrasado fueron crecidos en presencia de 1 mg/mL de C18:2. Esta concentración fue mayor que la informada por Hansen *et al.* (2015a), permitiendo así, explicar el aumento de la proporción de PUFA/MUFA en microorganismos crecidos en okara desengrasado (**Tabla I.3**). El mismo razonamiento puede ser realizado para los microorganismos crecidos en okara entero, lo que explica las alteraciones observadas en la composición de ácidos grasos.

Tabla I.3: Composición de ácidos grasos de *L. plantarum* CIDCA 83114 crecido en MRS, okara entero y desengrasado.

Ácidos Grasos	Okara entero	Okara desengrasado	MRS
C14:0	2.01 ± 0.10 (a) ^a	1.00 ± 0.05 (a)	4.68 ± 0.23 (a)
C16:0	25.83 ± 1.29 (a)	21.10 ± 1.06 (a)	31.75 ± 1.59 (b)
C16:1	n.d. ^b	0.63 ± 0.03 (a)	6.91 ± 0.35 (b)
C18:0	11.08 ± 0.56 (a)	6.93 ± 0.35 (b)	4.83 ± 0.24 (b)
C18:1	16.94 ± 0.85 (a)	20.00 ± 1.00 (b)	30.09 ± 1.52 (b)
C18:2	44.14 ± 2.21 (a)	47.32 ± 2.37 (b)	0.67 ± 0.03 (c)
cycC19:0	n.d.	0.49 ± 0.02 (a)	18.78 ± 0.94 (b)
I/S^c	1.57	2.30	0.63
PUFA/MUFA^d	2.61	2.29	0.02

^aEl análisis de varianza se realizó para cada ácido graso de manera individual (es decir, por línea). Letras diferentes (a,b,c,d) indican diferencias estadísticamente significativas para cada ácido graso.

n.d.^b, no detectado. I/S^c: relación insaturados/saturados. Los ácidos grasos insaturados incluyen C16:1, C18: 1 y C18:2. Los ácidos grasos saturados incluyen C14:0, C16:0, C18:0 y cycC19:0. PUFA/MUFA^d: relación poliinsaturados/monoinsaturados. Los ácidos grasos poliinsaturados incluyen C18:2 y los ácidos grasos monoinsaturados incluyen C16:1 y C18:1.

I.3.3. Efectos de los procesos de deshidratación sobre la recuperación y almacenamiento bacterianos

I.3.3.1. Viabilidad luego del proceso. En un paso posterior, se evaluó el efecto del medio de cultivo y de deshidratación sobre la recuperación de *L. plantarum* CIDCA 83114 luego de ser liofilizados o secados en *spray*. Los microorganismos liofilizados (en presencia y en ausencia de sacarosa), siendo la sacarosa un agente con capacidad protectora ampliamente reconocida (Leslie *et al.*, 1995; Gomez Zavaglia *et al.*, 2003), tuvieron una a_w más baja que los secados en *spray*, y las bacterias crecidas en okara (entero y desengrasado), valores más bajos que las crecidas en MRS (**Tabla I.4**).

Tabla I.4. Actividad de agua de *L. plantarum* CIDCA 83114 crecida en okara (entero y desengrasado) y en MRS, luego de ser liofilizados (sin y con 250 mM de sacarosa) o secados en *spray*.

Medio de cultivo	Condiciones de deshidratación	a_w^a
Okara entero	Liofilización	0.2544 ± 0.0011
	Liofilización con sacarosa	0.2466 ± 0.0023
	Secado en <i>spray</i>	0.3754 ± 0.0018
Okara desengrasado	Liofilización	0.2635 ± 0.0012
	Liofilización con sacarosa	0.2525 ± 0.0014
	Secado en <i>spray</i>	0.3904 ± 0.0017
MRS	Liofilización	0.4141 ± 0.0010
	Liofilización con sacarosa	0.2884 ± 0.0005
	Secado en <i>spray</i>	0.4772 ± 0.0019

^aActividad de agua después del tratamiento.

Por su parte, las bacterias crecidas en okara entero fueron las que mostraron la menor pérdida de viabilidad después de la liofilización en ausencia de sacarosa (grupos de barras a la izquierda en la **Figura I.5**). El valor $\log N/N_0$ para las bacterias crecidas en okara desengrasado fue significativamente menor ($p < 0.05$), y comparable con el de las bacterias crecidas en MRS y resuspendidas en PBS ($p > 0.05$). La adición de sacarosa en los medios de deshidratación mejoró la recuperación de microorganismos crecidos en okara desengrasado y MRS después de la liofilización ($p < 0.05$) y no tuvo un efecto significativo sobre las bacterias crecidas en okara entero ($p > 0.05$) (grupo de barras del medio). Es interesante observar que cuando las bacterias fueron liofilizadas en presencia

de sacarosa, el medio de crecimiento previo a la deshidratación no tuvo efecto significativo sobre la viabilidad ($p > 0.05$) (grupo barras del medio). En el proceso de secado en *spray*, la pérdida de viabilidad para los microorganismos crecidos en okara entero y desengrasado fue significativamente menor que la de las bacterias crecidas en MRS y resuspendidas en PBS ($p < 0.05$) (grupo de barras de la derecha), lo que indica que la composición del medio de deshidratación (okara u okara desengrasado) ejerce un efecto protector durante el secado en *spray*. La composición del medio de deshidratación es un factor determinante al momento de ejercer protección sobre las bacterias. Yonekura *et al.* (2014) informaron los cambios de viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* al momento de deshidratarla por secado en *spray* con medios encapsulantes, tales como alginato de sodio, quitosano y carboximetil celulosa. Los autores observaron una pérdida de viabilidad significativa para las bacterias secadas en quitosano, con un descenso de viabilidad de 3.5 ± 0.23 UFC/mL, y una pérdida en menor medida para las secadas en alginato de sodio, con un descenso de viabilidad 1.0 ± 0.13 UFC/mL. El único medio de deshidratación que no mostró cambios significativos fue el medio con carboximetil celulosa. Bustos y Bórquez (2013) informaron descenso de la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* al ser deshidratada en presencia de goma arábica y pectina. El medio con proteína de suero fue el único que no mostró diferencias significativas de viabilidad luego de someterlo al proceso de secado.

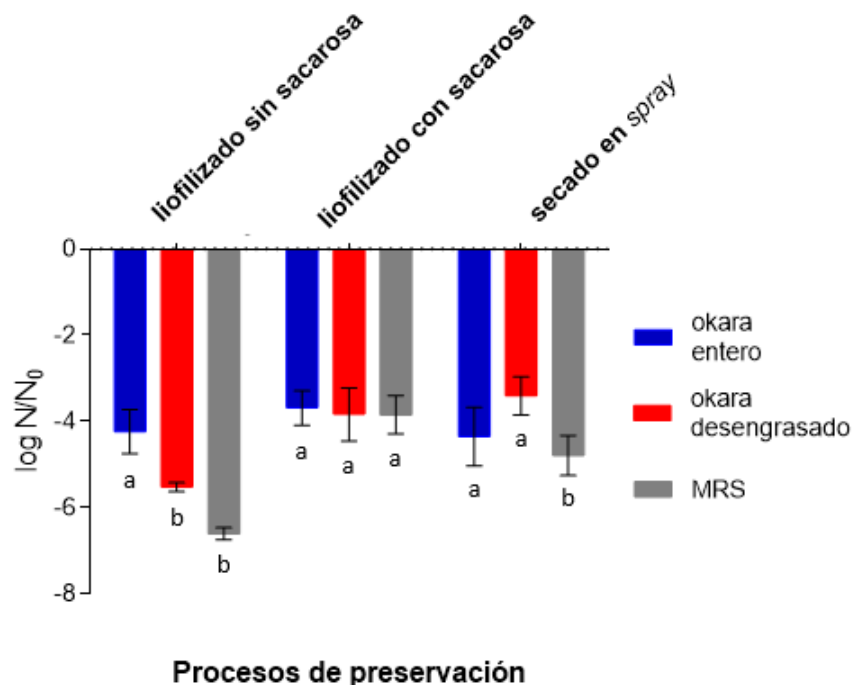


Figura I.5. Log N/N_0 de *L. plantarum* CIDCA 83114 crecido en okara entero (barras azules), okara desengrasado (barras rojas) y en MRS (barras grises) después de la liofilización en ausencia de sacarosa (grupo de la izquierda), liofilización en presencia de sacarosa (grupo del medio) y secadas en *spray* (grupo de la derecha). N_0 corresponde a recuentos en placa de cultivos frescos en fase estacionaria antes de cada tratamiento. Este valor fue de 13.60 ± 0.30 log UFC/mL para el okara entero, 13.35 ± 0.53 log UFC/mL para el okara desengrasado y 13.68 ± 0.42 log UFC/mL para MRS. N corresponde a los recuentos en placa inmediatamente después de cada tratamiento (log UFC/mL). Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

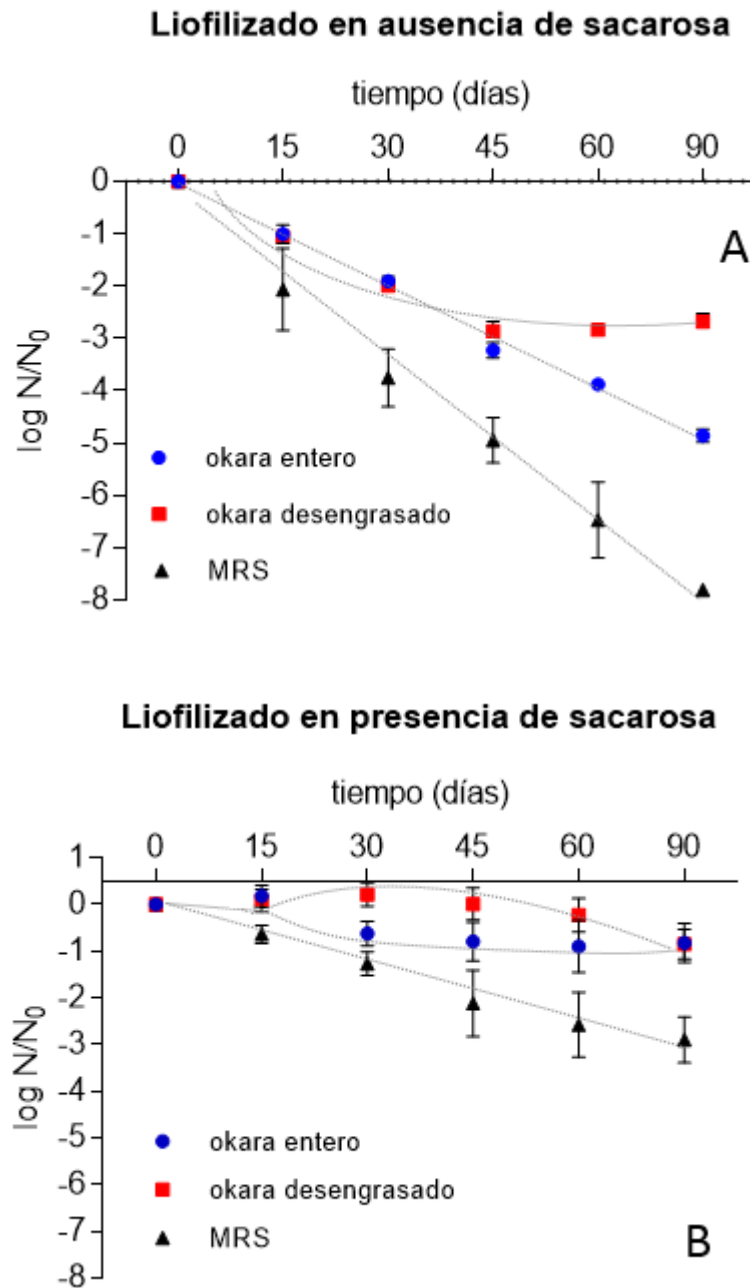
También se analizó el efecto del medio de cultivo en los procesos de conservación. Los microorganismos crecidos en okara entero no mostraron diferencias significativas en los valores de Log N/N_0 luego de los tres tratamientos ($p > 0.05$) (Figura I.5, barras azules). A su vez, para las bacterias crecidas en okara desengrasado y en MRS (barras rojas y grises, respectivamente), el secado en *spray* y la liofilización en presencia de sacarosa fueron significativamente menos perjudiciales que la liofilización en ausencia de sacarosa ($p < 0.05$). Estos resultados indican que la composición lipídica de *L. plantarum* crecidas en los tres medios diferentes fue un factor determinante al momento de someterse al proceso de liofilización. La composición lipídica de *L. plantarum* crecidos en okara entero presentó porcentajes diferentes en cada grupo de ácidos grasos respecto a los microorganismos crecidos en okara desengrasado, y es posible que estos cambios hayan provocado un mayor efecto protector al momento de congelar los medios para deshidratarlos por liofilización. Como ya se nombró

anteriormente, la composición lipídica juega un rol importante en la resistencia de las bacterias a los procesos de congelación, y estos cambios observados en los diferentes medios influyó en la respuesta de *L. plantarum* a este proceso de congelación. Al agregar un agente protector, como en el caso de las muestras liofilizadas con sacarosa, no se observaron diferencias en ninguno de los casos. Por su parte, al momento de deshidratar las muestras por secado por *spray*, la matriz okara (entera o desengrasada) protegió de la misma manera a los microorganismos durante el proceso de secado.

I.3.3.2. Viabilidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 durante el almacenamiento.

La pérdida de viabilidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 durante el almacenamiento a 4°C se muestra en las **Figura I.6 (A, B y C)**. El proceso de deshidratación por liofilización en ausencia de sacarosa fue el proceso más perjudicial para *L. plantarum* CIDCA 83114 crecido en los tres medios de cultivo (**Figura I.6 A**). Luego de 90 días de almacenamiento a 4 °C, la viabilidad de los microorganismos crecidos en okara entero y desengrasado descendió 4.62 ± 0.25 y 2.65 ± 0.06 unidades logarítmicas, respectivamente, con respecto a la viabilidad obtenida inmediatamente después de la liofilización, considerada como N_0 (tiempo 0). Se observó un efecto significativamente más perjudicial para los microorganismos crecidos en MRS ($p < 0.05$), con una disminución de 7.10 ± 0.14 unidades logarítmicas al cabo de los 90 días de almacenamiento a 4 °C. La adición de sacarosa al medio de deshidratación tuvo un efecto protector durante el almacenamiento en las tres condiciones analizadas (**Figura I.6B**). En esta condición, los microorganismos crecidos en okara entero y desengrasado no mostraron una disminución significativa de la viabilidad con respecto a los valores obtenidos inmediatamente después de la liofilización ($p > 0.05$). Aunque la viabilidad de los microorganismos crecidos en MRS disminuyó significativamente durante el almacenamiento ($p < 0.05$), esta disminución fue menor que la observada para las bacterias crecidas en MRS y liofilizadas en ausencia de sacarosa (**Figura I.6A**). A su vez, el secado en *spray* resultó un proceso adecuado para estabilizar las bacterias crecidas en okara entero y desengrasado durante los 90 días a 4 °C (**Figura I.6C**). En esta condición, no se observó una pérdida significativa de la viabilidad para bacterias crecidas en okara entero ($p < 0.05$), y en el caso de las bacterias crecidas en okara desengrasado se observó una pérdida de 2.71 ± 0.22 unidades logarítmicas. Las

bacterias crecidas en MRS y secadas en *spray* mostraron la mayor caída de viabilidad para este proceso (4.15 ± 0.66 unidades logarítmicas) después de 90 días de almacenamiento.



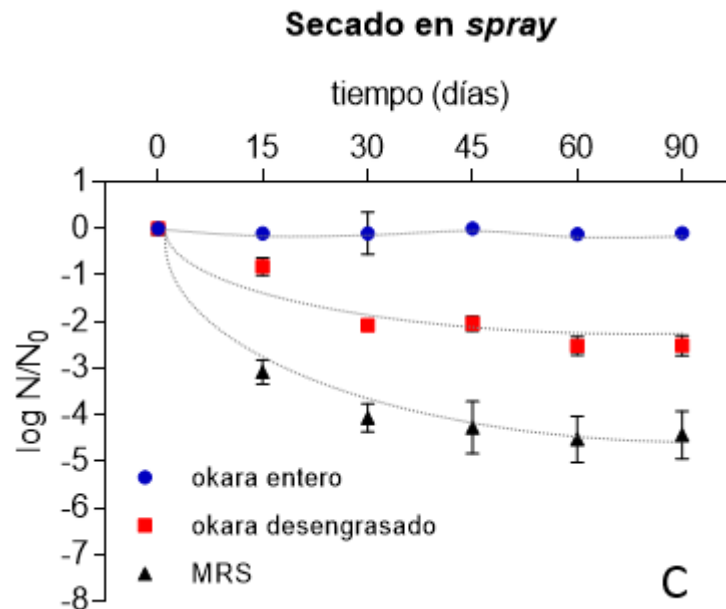


Figura I.6 (A, B y C). Log N/N_0 de *L. plantarum* CIDCA 83114 durante el almacenamiento. N_0 : viabilidad obtenida inmediatamente después de cada proceso de conservación (en log UFC/mL) y corresponde a los valores de N utilizados en la **Figura I.5**. N : viabilidad a tiempo t (log UFC/mL). Círculos azules llenos: bacterias crecidas en okara entero; Cuadrados rojos: bacterias crecidas en okara desengrasado; Triángulos negros: bacterias crecidas en MRS. (A) Liofilización en ausencia de sacarosa; (B) Liofilización en presencia de sacarosa (C) Secado en *spray*. Las líneas de puntos representan las regresiones matemáticas (**Tabla I.5**). En los casos en que no hubo descensos significativos de la viabilidad (**Tabla I.5**), los valores experimentales fueron conectados sin regresión alguna.

Es sabido que los compuestos polihidroxiados, principalmente azúcares y fibra, se usan generalmente como compuestos protectores durante la liofilización, secado en *spray* y almacenamiento de bacterias lácticas (Tymczyszyn *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2014; Romano *et al.*, 2015). La fibra y los oligosacáridos presentes en okara podrían mejorar la capacidad de las bacterias para superar los procesos de liofilización y secado en *spray* y por otra parte, estabilizar a los microorganismos durante el almacenamiento (**Figura I.6**) (Hincha *et al.*, 2003; Sosa *et al.*, 2016). La adición de sacarosa en el medio de deshidratación mejoró la recuperación de microorganismos crecidos en okara desengrasado y en MRS (**Figura I.6B**), el cual fue un resultado esperado teniendo en cuenta el efecto protector de la sacarosa durante la preservación de bacterias lácticas (Tymczyszyn *et al.*, 2007a). En este sentido, es importante mencionar que aunque hay artículos recientes que informan sobre el metabolismo de la sacarosa en cepas de *L. plantarum* (Chen *et al.*, 2014; Mendoza-Llerenas *et al.*, 2016), en este capítulo, *L.*

plantarum CIDCA 83114 no estuvo expuesto a sacarosa durante su crecimiento. Por lo tanto, puede concluirse que la sacarosa no es hidrolizada y actúa como un agente protector.

El ajuste matemático de los gráficos de almacenamiento (**Tabla I.5**) permitió la descripción de tres grupos diferentes:

(a) sin descenso significativo de la viabilidad después de 90 días de almacenamiento: este grupo incluyó bacterias crecidas en okara entero, liofilizados en presencia de sacarosa o secadas por *spray*, y microorganismos crecidos en okara desengrasado y liofilizados en presencia de sacarosa (**Figura I.6 y Tabla I.5**).

(b) Descenso lineal de la viabilidad luego de 90 días de almacenamiento: este grupo incluyó bacterias crecidas en okara y liofilizadas en ausencia de sacarosa, y aquellas crecidas en MRS, liofilizadas en presencia o ausencia de sacarosa (**Tabla I.5**). La ecuación I.5 describe el comportamiento de este grupo.

(c) Descenso no lineal de la viabilidad luego de 90 días de almacenamiento: en este grupo se encuentran las bacterias crecidas en okara desengrasado liofilizados en ausencia de sacarosa o secadas en *spray*, y bacterias cultivadas en MRS y luego secadas en *spray* (**Tabla I.5**). La ecuación I.6 describe el comportamiento de este grupo.

Para los productos que contienen probióticos, la legislación nacional (Código Alimentario Argentino art 1839; Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011) y las diferentes legislaciones internacionales (Aquilina *et al.*, 2013; Hill *et al.*, 2014; Phuapaiboon *et al.*, 2013; Tripathi y Giri, 2014) han establecido una viabilidad bacteriana de al menos 10^6 - 10^7 UFC/g al momento de ser consumidos. Los parámetros k (constante de velocidad de inactivación bacteriana) obtenidos de las ecuaciones I.5 y I.6 (**Tabla I.5**) representan herramientas importantes para calcular valores de viabilidad bacteriana en este tipo de productos durante su almacenamiento y en función de los resultados obtenidos es posible concluir que las matrices de okara resultaron adecuadas para estabilizar *L. plantarum* CIDCA 83114 en las condiciones de almacenamiento establecidas, aumentando de esta manera la vida útil de este subproducto.

Tabla I.5. Constantes de velocidad de inactivación de *L. plantarum* CIDCA 83114 crecida en okara (entero y desengrasado) y en MRS, luego de ser liofilizados (sin y con 250 mM de sacarosa) o secados en *spray*.

Medio de Cultivo	Condiciones de deshidratación	MODELOS		
		Sin disminución significativa de viabilidad	Lineal ^a	No lineal ^b
Okara entero	Liofilización		k: 0.053 días ⁻¹ (R ² :0.9618)	
	Liofilización con sacarosa	X ^c		
	Secado en <i>spray</i>	X		
Okara desengrasado	Liofilización			k: 0.04254 días ⁻¹ A:2.994 (R ² :0.9239)
	Liofilización con sacarosa	X		
	Secado en <i>spray</i>			k:0.03561 días ⁻¹ A:2.881 (R ² :0.9536)
MRS	Liofilización		k:0.0780 días ⁻¹ (R ² :0.9419)	
	Liofilización con sacarosa		k:0.035 días ⁻¹ (R ² :0.9622)	
	Secado en <i>spray</i>			k:0.1216 días ⁻¹ A:4.082 (R ² :0.9193)

^aEl ajuste lineal está dado por la Ecuación I.5: $\log N/N_0 = -kt$, donde $N = \text{UFC/mL}$, donde $N_0 = \text{UFC/mL}$ en el momento igual a t_0 , $t = \text{tiempo de almacenamiento en días}$; $k = \text{constante de inactivación bacteriana en días}^{-1}$. ^bEl ajuste no lineal está dado por la Ecuación I.6: $y = -A e^{-kt} + A$, donde $N = \text{UFC/mL}$ a tiempo t ; $N_0 = \text{UFC/mL}$ a tiempo 0; $t = \text{tiempo de almacenamiento expresado en días}$, $k = \text{constante de inactivación bacteriana en días}^{-1}$; $A = \text{valor de } \log N/N_0 \text{ una vez que alcanzó valores constantes}$. ^cX indica las condiciones en las que no se observó una disminución significativa de la viabilidad durante el almacenamiento.

I.3.4. Propiedades antioxidantes del okara fermentado con *L. plantarum* CIDCA 83114

Las propiedades antioxidantes del okara fermentado con *L. plantarum* CIDCA 83114 se determinaron comparando los valores del okara entero con los del grano de soja. Coulibaly *et al.*, 2008 informaron que la pérdida de viabilidad bacteriana está asociada a un efecto combinado de la temperatura y la oxidación de los componentes celulares. Esta oxidación se debe a que la exposición de productos deshidratados al oxígeno estimula la producción de ROS (especies reactivas al oxígeno), los cuales son tóxicos para las células vivas (Kashmiri y Mankar, 2014; Tripathi y Giri, 2014; Santos-

Sanchez *et al.*, 2019). Los ROS son altamente reactivos y causan el daño oxidativo de proteínas, lípidos y DNA, lo que conduce a la pérdida de su función y, en última instancia, la muerte celular (Ortiz *et al.*, 2012). Entre los mecanismos de acción de los antioxidantes, se encuentra su capacidad secuestrante de radicales libres, lo que reduce el daño oxidativo sobre las bacterias (Namiki. 1990). Por la importante función de estos compuestos es que en este trabajo de tesis se consideró oportuno investigar las propiedades antioxidantes del okara y del okara fermentado, usando al grano de soja como control.

I.3.4.1 Puesta a punto de la extracción de fitoquímicos.

En una primera fase, se evaluaron diferentes mezclas de solventes para extraer los fitoquímicos presentes en el okara molido. Se estudió en qué proporciones de etanol:agua la extracción de compuestos antioxidantes era la mas eficiente. A partir de los resultados obtenidos se eligió una de las mezclas de solventes para las determinaciones en las tres muestras estudiadas (okara fermentado, okara y grano de soja molido).

Luego de realizar la extracción según lo explicado en Materiales y metodos, sección I.2.13 y una vez removidos los excedentes de etanol en rotavapor y los de agua por liofilización, se obtuvieron las muestras presentadas en la **Figura I.7**, donde se puede observar que a mayor proporción de etanol, más líquido es el extracto.

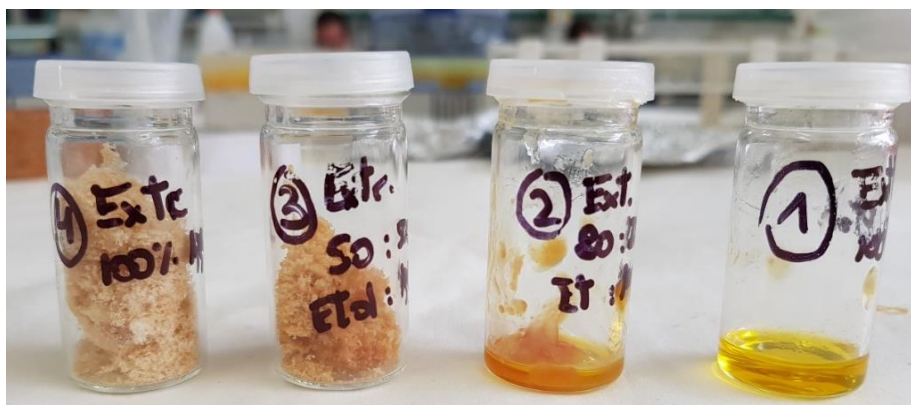


Figura I.7. Extractos de okara con diferentes mezclas etanol:agua. De derecha a izquierda: 100% etanol, etanol:agua 80:20, etanol:agua 50:50 y 100% agua.

Cada muestra fue sometida a todos los ensayos descritos en materiales y métodos (TPC, TFC, ABTS^{•+}, DPPH[•] y O₂^{•-}). En la **Figura I.8** se presentan los resultados de compuestos fenólicos totales (TPC) y compuestos flavonoides totales (TFC) para cada uno de los extractos.

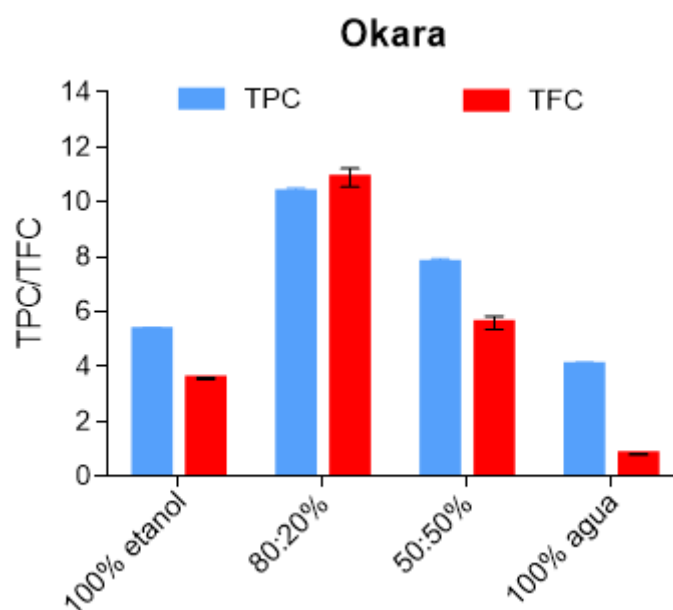


Figura I.8. TPC y TFC en muestras de okara, usando diferentes relaciones de etanol:agua como solvente de extracción. Barras azules: TPC; Barras rojas: TFC

Los mejores rendimientos de extracción se obtuvieron para el grupo correspondiente al extracto obtenido utilizando etanol:agua 80:20 (Extracto 80), tanto para los valores de TPC como de TFC, seguido por el extracto obtenido utilizando etanol:agua 50:50, con valores significativamente menores ($p < 0.05$). Cuando se realizaron los ensayos del catión radical ABTS (ABTS^{•+}), actividad anti radical (DPPH[•]) y capacidad secuestrante de radicales O₂^{•-} *in vitro* se observó un panorama similar, tal como se observa en la **Figura I.9**.

Al igual que en los otros ensayos, el grupo que mostró mejores resultados fue el correspondiente al extracto etanol:agua 80:20 (Extracto 80). En este caso, se observaron valores superiores de O₂^{•-} en el extracto 100% etanol y valores similares de DPPH[•] que el extracto etanol:agua 80:20, pero hubo una diferencia significativa en el ensayo de ABTS^{•+} entre ambos grupos. El grupo 50:50 también mostró valores similares al grupo 80:20, pero una diferencia significativa en cuanto a sus valores de O₂^{•-}. En este sentido, el grupo 80:20 dio lugar a valores superiores al resto de las condiciones establecidas,

para la mayoría de los ensayos. Por esta razón, se decidió usar esta proporción (80:20 etanol:agua) para hacer la extracción en las muestras de interés de este trabajo de tesis.

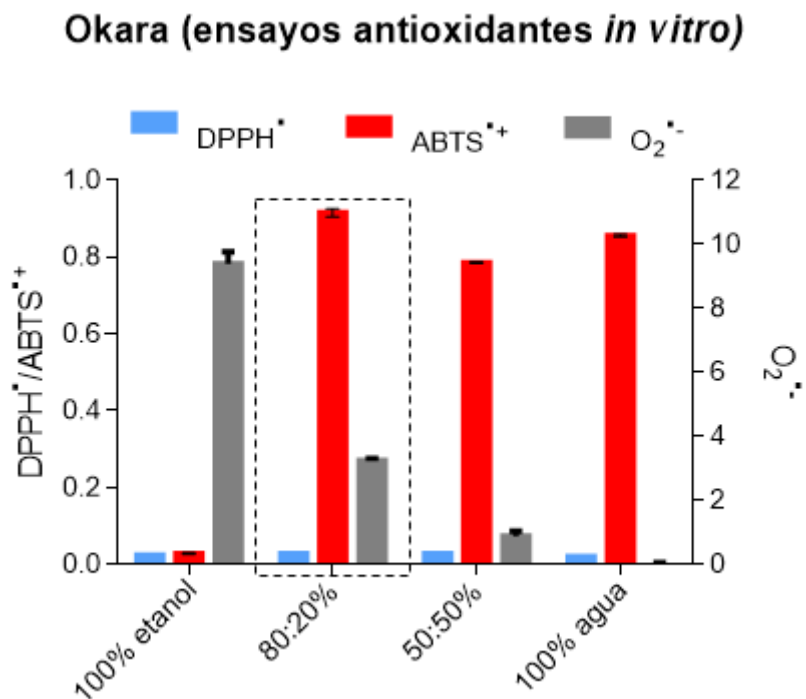


Figura I.9. Determinación *in vitro* de ABTS^{•+}, DPPH[•] y capacidad secuestrante de radical O₂^{•-}. Los fitoquímicos fueron extraídos usando diferentes proporciones de etanol:agua como solvente de extracción. Barras azules: ensayos de DPPH[•]; Barras rojas: ensayos de ABTS^{•+}; Barras grises: ensayos de O₂^{•-}.

Como se mencionó anteriormente, se estudió el okara fermentado y el okara sin fermentar, y se lo comparó con los granos de soja. Las tres muestras fueron sometidas a diferentes condiciones:

A- Etanol:agua 80:20;

B- Simulación de digestión gástrica;

C- Digestión intestinal

D- Digestión intestinal seguido de adición de *L. plantarum* CIDCA 83114 (sólo para muestras de granos de soja y okara entero).

En total se obtuvieron 11 muestras (**Figura I.10**), que fueron preparadas para la determinación de TPC, TFC, y compuestos antioxidantes.

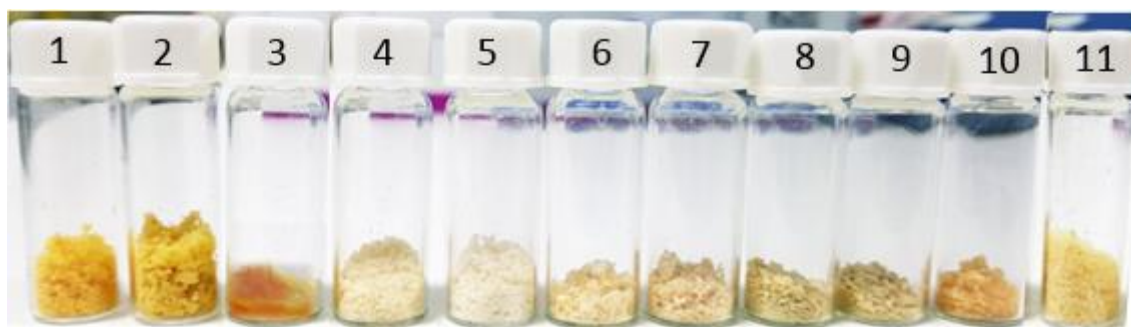


Figura 1.10. Muestras de granos de soja, okara entero y fermentado, sometidas a los diferentes tratamientos. 1 – Extracto de grano de soja; 2 – Extracto de okara entero; 3 – Extracto de okara fermentado; 4 – Digestión gástrica del grano de soja; 5 – Digestión gástrica del okara entero; 6 – Digestión gástrica del okara fermentado; 7 – Digestión intestinal del grano de soja; 8 – Digestión intestinal okara entero; 9 – Digestión intestinal okara fermentado; 10 – Digestión intestinal del grano de soja con adición de bacterias; 11 – Digestión intestinal del okara entero con adición de bacterias.

I.3.4.2 Compuestos antioxidantes

I.3.4.2.1. Compuestos fenólicos totales (TPC). En la **Figura 1.11** se puede observar el contenido de TPC del okara fermentado, okara entero y granos de soja, luego de la extracción con etanol:agua 80:20, así como después de la exposición a condiciones gástricas e intestinales simuladas, en presencia o ausencia *L. plantarum* CIDCA 83114.

La extracción con etanol:agua (80.20) de okara entero mostró los valores más elevados, aun mayores que los granos de soja y el okara fermentado (**Figura 1.11, barras azules**). Algunos autores informaron que los granos de soja tienen más del doble de la cantidad de TPC que el okara (Ambawat y Khetarpaul, 2018). Sin embargo, la composición fenólica de la soja y sus subproductos varía en función de la especie, el cultivo, estación, las condiciones geográficas y ambientales, la madurez de grano, la temperatura de procesamiento, y también en función del proceso de extracción y de los métodos de análisis (Ma *et al.*, 2014; Rodríguez-Roque *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2018). En este sentido, un calentamiento excesivo durante el proceso de producción de leche de soja a partir del cual se genera el okara, podría contribuir a solubilizar compuestos bioactivos de la matriz de la soja. Por su parte, las celulosas y hemicelulosas presentes en la soja y el okara pueden interactuar con los compuestos fenólicos, y el tratamiento térmico lleva a la degradación de las fibras, lo cual facilita la liberación de compuestos fenólicos (Ma *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2018). En cuanto al extracto etanólico del okara

fermentado, no mostró aumentos en los valores de TPC. Recientemente, Sanjukta *et al.*, 2015 informaron que la fermentación de la soja genera un elevado aumento de los contenidos fenólicos (hasta un 78%). Esta aparente inconsistencia podría estar relacionada con el material de partida (fermentación de soja en lugar de fermentación de okara), pero principalmente con la cepa bacteriana utilizada. Sanjukta *et al.*, 2015 emplearon *Bacillus subtilis*, que pertenece a un género y especie diferentes al *L. plantarum* utilizado en este trabajo de tesis, siendo responsables del grado y especificidad de liberación de compuestos fenólicos.

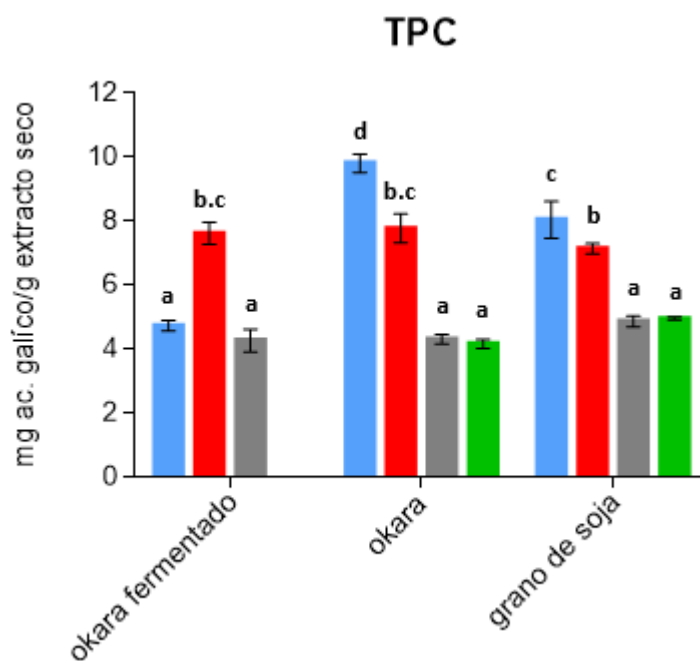


Figura I.11. Compuestos fenólicos totales (TPC) para el okara fermentado, el okara y el grano de soja. Barras azules: extractos obtenidos con la mezcla etanol:agua 80:20; **Barras rojas:** muestras sometidas a digestión gástrica; **Barras grises:** muestras sometidas a digestión intestinal; **Barras verdes:** digestión intestinal con el agregado de *L. plantarum* CIDCA 83114. Letras diferentes (a,b,c) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

La disminución de TPC del okara entero en condiciones gástricas (**Figura I.11, barras rojas**) podría ser el resultado de la exposición a pH bajo y a la pepsina, que puede facilitar la liberación de algunos compuestos fenólicos unidos a carbohidratos, haciéndolos más bioaccesibles. Sin embargo, la fibra representada por las celulosas y las hemicelulosas presentes tanto en la soja como en okara, también podría interactuar con los compuestos fenólicos, limitando su bioaccesibilidad. El balance entre estos dos

factores da como resultado una ligera disminución de TPC en las condiciones gástricas tanto para la soja como para el okara. En este sentido, Velderrain-Rodriguez (2016) informó que la fibra dietaria interactúa con los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos a través de enlaces no covalentes, tales como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals. Teniendo en cuenta que el número y la conformación de los grupos hidroxilo determina la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos, su interacción con la fibra alimentaria no sólo podría limitar su absorción, sino que también evitaría que estos grupos estabilicen a los radicales libres (Velderrain-Rodriguez *et al.*, 2016).

Es interesante observar que los extractos etanólicos del okara fermentado (**Figura I.12, barras azules**) tuvieron un TPC significativamente inferior al de los granos de soja y el okara. Sin embargo, cuando se expusieron a condiciones gástricas, dicho contenido fue comparable con el de las otras muestras expuestas a las mismas condiciones. La recuperación de TPC después de la digestión gástrica presentó un porcentaje de 79% (okara) y 89% (soja) con respecto a los extractos etanólicos de las muestras. Se informaron resultados similares para compuestos fenólicos liberados a partir de harina de soja (subproducto de la producción de aceite de soja) después de la digestión gástrica (Freitas *et al.*, 2018). Sin embargo, ha sido publicado que la digestión gástrica de la leche de soja aumenta el contenido de compuestos fenólicos de 70 - 152% (Ma *et al.*, 2014; Rodriguez-Roque *et al.*, 2013). Esto permite suponer que la extracción de compuestos fenólicos después de la digestión se lograría principalmente durante la fase gástrica. La exposición a bajo pH y actividad enzimática (pepsina) favorece la hidrólisis de los compuestos fenólicos unidos a otros componentes de la matriz (proteínas, carbohidratos, celulosas, lignina), mejorando así su extracción (Ma *et al.*, 2014; Rodriguez-Roque *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2018). En base a estos resultados, la liberación de compuestos fenólicos durante la digestión gástrica dependería del pH y de la matriz del alimento.

Luego de la exposición a condiciones intestinales, el TPC disminuyó significativamente en todas las muestras (un 32% en el grano de soja y 45% en el okara respecto al extracto etanol:agua) y no se observaron diferencias en el contenido fenólico entre los tres casos. Diferentes autores informaron resultados similares (Ma *et al.*, 2014; Rodriguez-Roque *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2018) con respecto al contenido fenólico de

la harina de soja y de la leche de soja después de la digestión intestinal en comparación con la fase gástrica. Por su parte, la incorporación de *L. plantarum* CIDCA 83114 al medio intestinal no tuvo influencia en el TPC de la soja y el okara (**Figura I.11, barras verdes**). Los compuestos fenólicos son altamente inestables en las condiciones alcalinas del intestino delgado. En tales condiciones, las estructuras vegetales se degradan, lo que favorece la liberación de compuestos fenólicos presentes en la soja y el okara, de diferentes formas como por ejemplo ácido p-hidroxibenzoico, ácido salicílico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico (Kim *et al.*, 2006). El ambiente intestinal promueve diferentes alteraciones en la estructura química/peso de los compuestos fenólicos (hidrólisis, oxidación, epimerización e incluso degradación), lo que afecta su biodisponibilidad (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007; Bouayed *et al.*, 2011).

I.3.4.2.2. Contenido total de flavonoides (TFC). En la **Figura I.12** se presentan los valores de TFC para los extractos etanólicos de okara fermentado, okara y grano de soja, así como los valores correspondientes luego de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Con respecto a los extractos obtenidos antes de la digestión, el okara mostró los valores de TFC más elevado (**Figura I.12. Barras azules**), siendo incluso más altos que los obtenidos para los granos de soja. El carácter hidrofóbico de los flavonoides explica los valores observados para el grano de soja y el okara. Debido a que la leche de soja se obtiene mediante una extracción acuosa, los compuestos hidrofóbicos como los flavonoides (*e.g.*, isoflavonas de soja) no pueden ser extraídos con eficacia. Esto explica por qué los valores de TFC son normalmente bajos para la leche de soja. El TFC más alto observado para el okara puede explicarse considerando que después de la extracción, los flavonoides permanecieron más concentrados en el subproducto restante (okara). Por último, la fermentación de okara no incrementó las concentraciones de flavonoides.

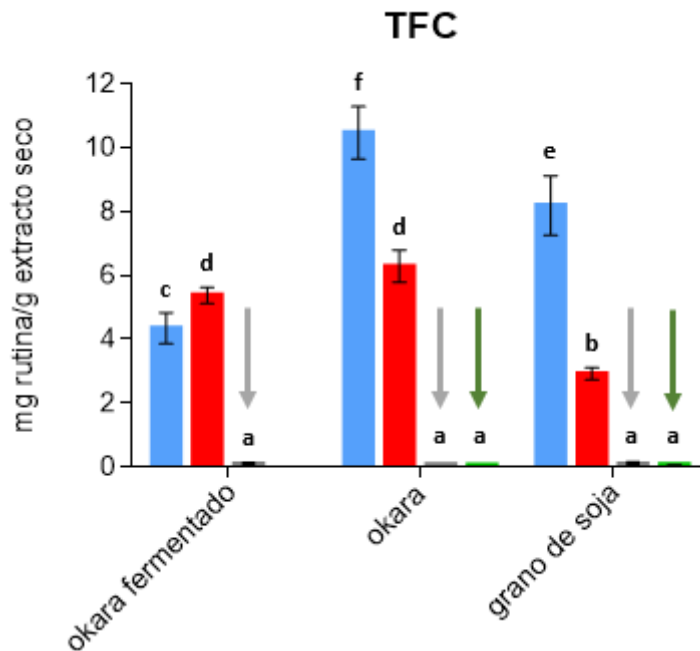


Figura I.12. Compuestos flavonoides totales (TFC) para el okara fermentado, el okara y el grano de soja. Barras azules: extractos a partir de mezcla etanol:agua 80:20; Barras rojas: muestras sometidas a digestión gástrica; Barras grises: muestras sometidas a digestión intestinal; Barras verdes: digestión intestinal con el agregado de *L. plantarum* CIDCA 83114. Letras diferentes (a,b,c,etc) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Luego de la exposición a condiciones gástricas simuladas, el contenido de TFC fue mayor para el okara (no fermentado y fermentado) que para la soja. La disminución de TFC para los granos de soja fue la más drástica, en comparación con los valores iniciales (35%) (**Figura I.12, granos de soja, barras rojas**). Es interesante observar que aunque el okara fermentado tuvo un TFC más bajo que las otras dos muestras en los extractos iniciales, la exposición a las condiciones gástricas condujo a un aumento de la TFC, alcanzando valores comparables a los del okara no fermentado expuesto a las mismas condiciones (**Figura I.12, okara y okara fermentado**). Ha sido informado que el contenido de flavonoides en la harina de soja (analizados por HPLC) disminuye 21.6% durante la fase gástrica (Freitas *et al.*, 2018). Otros autores observaron un aumento de TFC en la leche de soja después de la digestión gástrica (de 4 a 33%) (Ma *et al.*, 2014; Rodríguez-Roque *et al.*, 2013). Tal como se explicó anteriormente, las características de la matriz podrían ser determinantes a la hora de explicar diferencias entre los resultados obtenidos y los publicados en bibliografía.

Finalmente, la exposición a condiciones intestinales llevó a una disminución drástica (>97%) de TFC en las tres muestras (**Figura I.12, barras grises-flechas grises**). La

presencia de jugos intestinales y bilis podría haber afectado la estabilidad de los flavonoides de soja en el medio intestinal. Ha sido publicado que el contenido de flavonoides en harina de soja se redujo hasta el 57.93%, en comparación con la digestión gástrica (Freitas *et al.*, 2018). Asimismo, la presencia de *L. plantarum* CIDCA 83114 en el medio intestinal no dio lugar a diferencias significativas en comparación con las muestras expuestas al medio intestinal en ausencia de bacterias (**Figura I.12, barras verdes-flechas verdes**).

La concentración de compuestos fenólicos totales, determinada como TPC y TFC, después de la exposición a las fases gástrica e intestinal, así como a la digestión intestinal con el agregado de *L. plantarum* CIDCA 83114 fueron significativamente más bajas que las determinadas en los extractos etanólicos antes de la digestión. Los flavonoides parecen estar más afectados (-99%) por las condiciones intestinales severas que los compuestos no flavonoides (reducción de entre 40-56%). Un trabajo previo informó que la extracción química (con solventes orgánicos) podría llevar a una sobreestimación de la disponibilidad de compuestos fenólicos, en comparación con la extracción gastrointestinal (Bouayed *et al.*, 2011). El tracto gastrointestinal puede considerarse como un extractor en el que tanto la acción mecánica como la acción química contribuyen a la extracción de compuestos fenólicos. Sin embargo, las concentraciones de compuestos extraíbles fueron significativamente más bajas en comparación con las obtenidas por extracción química (usando etanol:agua 80:20), lo que indica una liberación incompleta o degradación de compuestos fenólicos (Bouayet *et al.*, 2011). Los compuestos fenólicos de soja y sus subproductos generalmente se extraen utilizando diferentes solventes orgánicos (etanol, metanol, acetona, etc.) o en combinación con agua en diferentes proporciones (Jankowiak *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2018). En general, los contenidos de compuestos fenólicos obtenidos de las extracciones con agua son inferiores a los obtenidos con solventes orgánicos. Tal como se mostró en este trabajo de tesis (**Figura I.12**), la mezcla etanol:agua 80:20 permitió la extracción de hasta 2.52 veces más compuestos fenólicos que el agua (100%). Otros autores obtuvieron resultados similares (Jankowiak *et al.*, 2014). Cuando se usa agua, las agliconas no se solubilizan, y la unión entre las isoflavonas glicosiladas y la matriz no se ve afectada. El etanol promueve la liberación de compuestos fenólicos y reduce la

coextracción de otros componentes, lo que conduce a mayores rendimientos y pureza (Jankowiak *et al.*, 2014).

I.3.4.2.3. Actividad antioxidante *in vitro*. El contenido fenólico del material vegetal está relacionado con su actividad antioxidante (Ambawat *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2014). Las Figuras I.13, I.14 y I.15 muestran la evolución de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos y después de la digestión gastrointestinal *in vitro*, de acuerdo a los ensayos ABTS^{•+}, DPPH[•] y O₂^{•-}, respectivamente. La actividad antioxidante máxima se observó para el okara entero y los granos de soja, mientras que el okara fermentado mostró los valores más bajos independientemente del ensayo. Por el contrario, el agregado de *L. plantarum* luego de la digestión intestinal de los granos de soja incrementó la capacidad de secuestrar radicales DPPH[•] y O₂^{•-} (Sanjukta *et al.*, 2015). Se ha demostrado que la soja y sus derivados poseen actividad antioxidante (Ambawat *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2018; Sanjukta *et al.*, 2015; Vital *et al.*, 2018). En este sentido, Freitas *et al.* (2018) evaluó la capacidad antioxidante del extracto acuoso de harina de soja (subproducto de la producción de aceite de soja) por diferentes métodos e indicó que los compuestos antioxidantes presentes en este subproducto agroindustrial mantuvieron su funcionalidad, incluso después del procesamiento industrial. Por otra parte, Vital *et al.* (2018) informaron que el okara adicionado a leches enriquecidas en ácidos grasos omega-3 mostró capacidad antioxidante y disminuyó la oxidación de lípidos durante la exposición a la luz, demostrando que la incorporación del okara como ingrediente alimentario constituye una fuente económica y eficiente de antioxidantes en alimentos funcionales. Finalmente, Sanjukta *et al.* (2015), fermentaron diferentes variedades de granos de soja con dos cepas de *Bacillus subtilis* productoras de proteasas. La fermentación aumentó la actividad secuestrante de radicales (DPPH[•] y O₂^{•-}) de 3.1 a 24 veces, la actividad antioxidante total y el poder reductor en los extractos acuosos en comparación con la soja no fermentada.

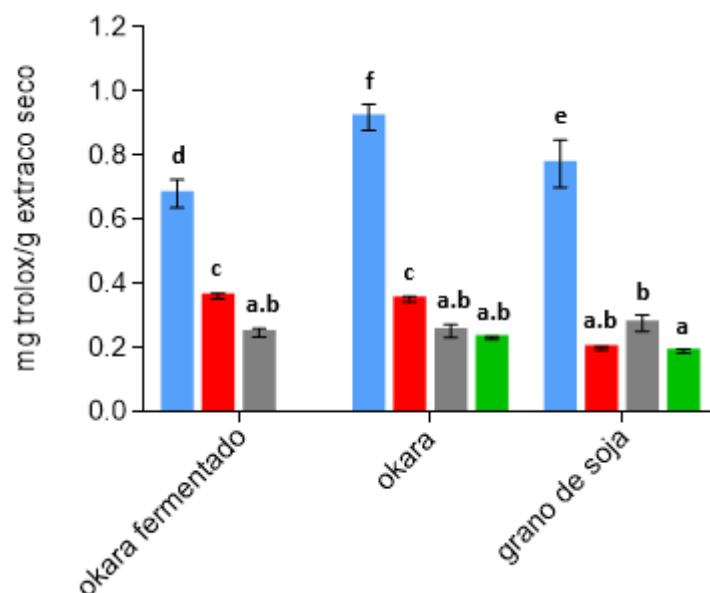


Figura I.13. Actividad antioxidante ABTS^{•+} para el okara fermentado, el okara y el grano de soja. Barras azules: extractos a partir de mezcla etanol:agua 80:20; Barras rojas: muestras sometidas a digestión gástrica; Barras grises: muestras sometidas a digestión intestinal; Barras verdes: digestión intestinal con el agregado de *L. plantarum* CIDCA 83114. Letras diferentes (a,b,c,etc) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Las actividades antioxidantes también fueron significativamente influenciadas por la digestión gastrointestinal *in vitro*. En efecto, cuando se expusieron las muestras a condiciones gástricas, se observó una disminución drástica de la actividad antioxidante. De hecho, la actividad antioxidante (ensayo ABTS^{•+}) de los granos de soja después de la exposición a condiciones gástricas se redujo al 25% con respecto a la actividad antes de la digestión (extractos etanólicos), y la del okara, al 38% (**Figura I.13, barras rojas**). Por su parte, la actividad antioxidante remanente determinada mediante el ensayo DPPH[•] fue del 20 y 27% con respecto a la determinada antes de la digestión, respectivamente (**Figura I.14, barras rojas**). Finalmente, la actividad secuestrante de radicales O₂^{•-} fue la más afectada por las condiciones gástricas, ya que en ninguno de los casos fue superior al 8% con respecto a los valores obtenidos antes de la digestión (**Figura I.14, granos de soja y okara**). Después de la digestión gástrica *in vitro*, la actividad antioxidante del okara fermentado no fue significativamente diferente a la del okara no fermentado, representando así sólo un 53% (ABTS^{•+}), 30% (DPPH[•]) y 38% (O₂^{•-}) de la actividad antioxidante inicial, según se determinó en los tres ensayos (**Figura I.13, I.14, I.15, okara fermentado**). Se sabe que la capacidad de remover radicales de los polifenoles es altamente dependiente del pH, y valores bajos de pH disminuyen esta actividad. Los

principales compuestos antioxidantes de la soja son las isoflavonas, y su interacción con la fibra dietética (también presente en grandes cantidades en todas las muestras analizadas), a pH ácido, probablemente bloqueó los grupos hidroxilo, que son los que impiden la estabilización de los radicales libres (Velderrain-Rodriguez *et al.*, 2016).

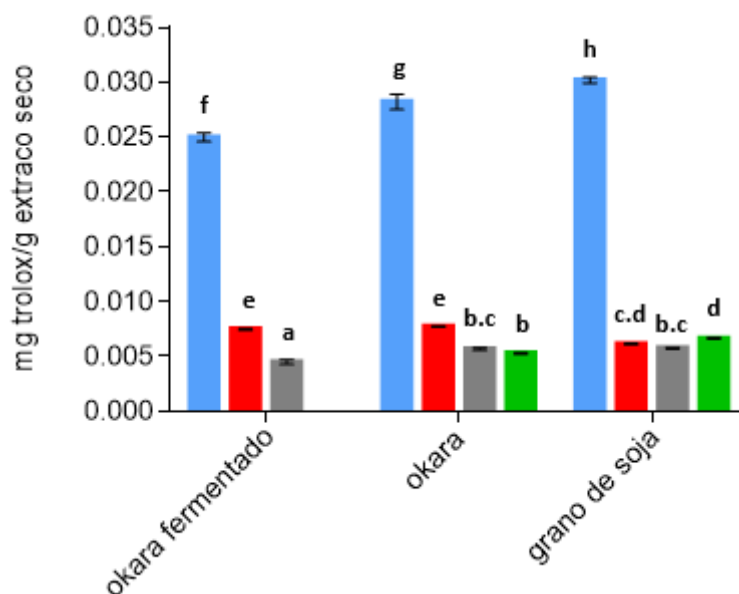


Figura I.14. Actividad antioxidante DPPH^{*}, para el okara fermentado, el okara y el grano de soja. Barras azules: extractos a partir de mezcla etanol:agua 80:20; **Barras rojas:** muestras sometidas a digestión gástrica; **Barras grises:** muestras sometidas a digestión intestinal; **Barras verdes:** digestión intestinal con el agregado de *L. plantarum* CIDCA 83114. Letras diferentes (a,b,c,etc) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Finalmente, el medio intestinal condujo a una disminución adicional de la actividad antioxidante. La presencia de *L. plantarum* CIDCA 83114 en el medio intestinal no dio lugar a diferencias significativas en comparación con las muestras expuestas al medio intestinal sin bacterias (**Figuras I.13, I.14 y I.15**). Estos resultados son consistentes con la información disponible en bibliografía (Ma *et al.*, 2014; Rodríguez-Roque *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2018). Por ejemplo, la actividad antioxidante de la leche de soja (determinada mediante el ensayo DPPH^{*}) disminuye después de la digestión gastrointestinal simulada (74-99%) (Ma *et al.*, 2014; Rodríguez-Roque *et al.*, 2013). En general, la disminución de la capacidad antioxidante del presente estudio resultó de la disminución considerable de TPC y TFC. La estabilidad y la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos dependen de las condiciones fisicoquímicas del tracto digestivo

(pH, temperatura y actividades enzimáticas), así como de la naturaleza de la matriz alimentaria (Bouayed *et al.*, 2011). El ambiente ácido en la fase gástrica permite la hidrólisis y la liberación de compuestos fenólicos ligados a ligninas, proteínas y carbohidratos (Ma *et al.*, 2014). El tratamiento con ácido hidroliza principalmente los enlaces glicosídicos y solubiliza los azúcares, liberando compuestos fenólicos y aumentando la actividad antioxidante (Freitas *et al.*, 2018). La pérdida de actividad antioxidante en condiciones intestinales no está asociada a las enzimas digestivas, sino mas bien a las condiciones químicas existentes durante la digestión intestinal. En este sentido, Bermúdez-Soto *et al.* (2007) demostraron que los compuestos fenólicos son altamente sensibles a las condiciones alcalinas del intestino delgado y que una buena proporción de estos compuestos puede transformarse en otras formas estructurales con diferentes propiedades químicas, desconocidas y/o no detectadas, que consecuentemente tienen diferente bioaccesibilidad, biodisponibilidad, y menor reactividad y actividad.

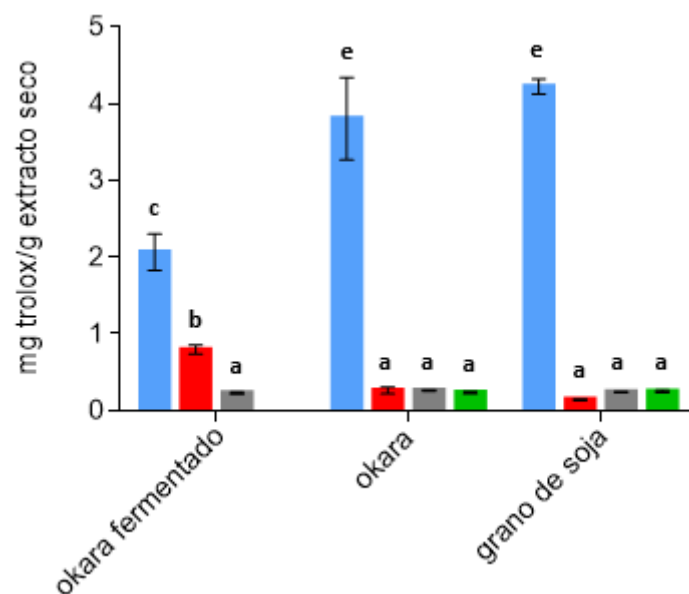


Figura I.15 . Actividad antioxidante determinada a través de O₂^{•-}, para el okara fermentado, el okara y el grano de soja. Barras azules: extractos a partir de mezcla etanol:agua 80:20; Barras rojas: muestras sometidas a digestión gástrica; Barras grises: muestras sometidas a digestión intestinal; Barras verdes: digestión intestinal con el agregado de *L. plantarum* CIDCA 83114. Letras diferentes (a,b,c,etc) indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

En un análisis posterior, se buscó establecer correlaciones entre los diferentes ensayos realizados. Sin embargo, no hubo una buena correlación entre los TPC y ensayos

de actividad antioxidante (**Tabla I.6**). Por el contrario, se encontraron buenas relaciones entre TFC y los radicales libres ensayados. De manera similar, ha sido informado que el TFC de leche de soja también correlaciona positivamente con la captación de DPPH[•] (Ma *et al.*, 2014).

Tabla I.6 - Coeficientes de correlación (r) entre TPC, TFC y ensayos de actividad antioxidante *in vitro*.

Parámetros	ABTS ^{•+}	DPPH [•]	O ₂ ^{•-}
TPC	0.627	0.644	0.622
TFC	0.883	0.816	0.842

Las bajas correlaciones obtenidas con TPC podrían estar relacionadas con el hecho de que el reactivo de Folin-Ciocalteu no es específico de los compuestos fenólicos. Otros compuestos como vitaminas, carbohidratos, aminas aromáticas, ácidos orgánicos o proteínas, también pueden reducir este reactivo, lo que lleva a sobreestimar los valores (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013). Por lo tanto, las correlaciones observadas sugieren que son los compuestos fenólicos, principalmente de tipo flavonoide, aquellos que desempeñan un papel importante como antioxidantes. En efecto, de acuerdo a la literatura, la genisteína, la daidzeína y la glicitaína son los componentes principales de la soja y el okara (Jankowiak *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2018).

Conclusiones

- El okara entero y el okara desengrasado demostraron ser medios de cultivos tan adecuados como el MRS para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114.
- Con respecto a los procesos de deshidratación, el medio okara entero fue el más adecuado para estabilizar a *L. plantarum* durante la liofilización (sin el agregado de sacarosa), mostrando menores descensos de viabilidad en comparación con el okara desengrasado y el MRS. Al momento de deshidratar los medios por secado en *spray*, el okara (tanto entero como desengrasado) demostró ser una matriz capaz de estabilizar y proteger a *L. plantarum* presentando una mayor viabilidad bacteriana en comparación al MRS.
- El crecimiento de *L. plantarum* en los medios okara entero y desengrasado, indujo cambios importantes en la composición de ácidos grasos, aumentando la relación de ácidos grasos insaturados y saturados (I/S) con respecto a las bacterias crecidas en MRS, provocando un aumento de la fluidez de la membrana, factor determinante para la recuperación bacteriana después de los procesos de deshidratación y almacenamiento.
- El secado en *spray* resultó ser el proceso más adecuado para estabilizar las bacterias crecidas tanto en okara entero como desengrasado durante su almacenamiento a 4 °C.
- A partir de las determinaciones antioxidantes, se pudo determinar que la concentración de compuestos antioxidantes bioaccesibles presentes en el okara fueron similares a los presente en los granos de soja. Asimismo, la fermentación del okara con *L. plantarum* CIDCA 83114 constituye una buena estrategia para agregarle valor a este residuo, ya que representa un vehículo adecuado de probióticos.

Sistema de microencapsulación

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

II.1. Microencapsulación de bacterias lácticas

La microencapsulación ha demostrado ser una estrategia exitosa para la protección de compuestos bioactivos, permitiendo su liberación controlada en sistemas específicos. Diversas técnicas de encapsulación son ampliamente utilizadas como barrera mecánica, para proteger microorganismos probióticos frente a diferentes ambientes adversos, tales como condiciones de procesamiento de alimentos, almacenamiento y las enzimas y jugos digestivos (Sanguansri y Augustin, 2007).

II. 2. Técnicas de microencapsulación de bacterias lácticas

II.2.1. Emulsiones

Aunque el agua y el aceite son sustancias inmiscibles, existen incontables ejemplos de materiales naturales y productos industriales donde los lípidos y el material acuoso se presentan en alguna forma de dispersión. Entre las dispersiones más frecuentes se encuentran las emulsiones, donde el aceite está presente en finas gotas en una fase acuosa continua (Coupland, 2006). Las emulsiones líquidas consisten en gotas de un líquido dispersas en otro líquido, que constituye la fase continua (Robins *et al.*, 2002). Las emulsiones se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza de las fases que la conforman. Así, un sistema que consiste en gotas de aceite distribuidas en un medio acuoso continuo se denomina emulsión aceite en agua (O/W), como es el caso de la leche, las cremas, algunas bebidas, mayonesas y salsas. Por otra parte, si la emulsión consiste en gotas de agua distribuidas en un medio oleoso continuo recibe el nombre de emulsión agua en aceite (W/O), como por ejemplo, la margarina o la manteca (McClements, 2015). Además de las emulsiones O/W y W/O tradicionales, existe otro grupo de emulsiones algo más complejas, denominadas emulsiones múltiples, como las emulsiones O/W/O (es decir, aceite-agua-aceite) o bien las W/O/W (agua-aceite-agua). Esta última emulsión, consiste en gotas de agua dispersas en gotas mayores de aceite, que a su vez están dispersas en un medio acuoso continuo (**Figura II.1**) (McClements y Li, 2010). La sustancia que conforma las gotas de una emulsión se denomina *fase dispersa*, *discontinua* o *interna*, mientras que la sustancia que compone el líquido circundante se llama *fase continua* o *externa* (McClements, 2005b).

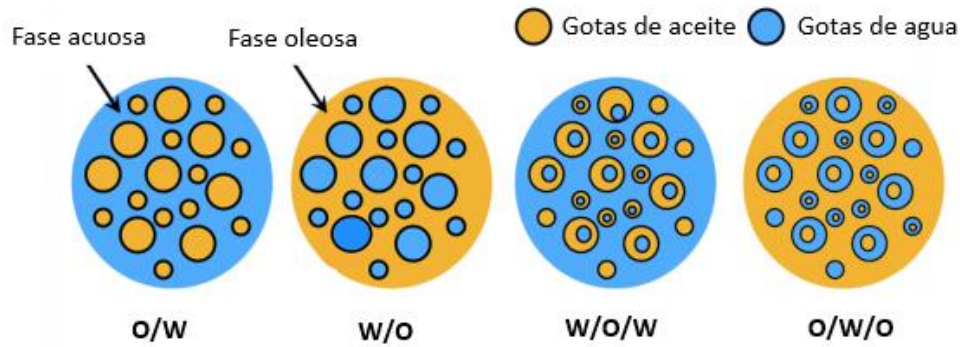


Figura II.1. Diferentes tipos de emulsiones

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables debido a que poseen una gran área interfacial, acompañada por una elevada tensión interfacial, lo que genera un aumento de la energía libre del sistema. Por esta razón, la obtención de emulsiones con diámetros de gotas inferiores a los 200 nm (nanoemulsiones) ha adquirido especial relevancia en los últimos años, debido a sus novedosas propiedades fisicoquímicas, tales como su mayor estabilidad (Teo *et al.*, 2016; Alzorqi *et al.*, 2016). Sin embargo, la nanoemulsificación no es una opción válida para la encapsulación bacteriana, debido a que el tamaño de las bacterias es del orden de los micrones.

II.2.1.1. Formación de emulsiones

El proceso por el cual dos líquidos inmiscibles se convierten en una emulsión se denomina *homogeneización*. La formación de gotas en una emulsión es un proceso que requiere energía, la cual es suministrada por dispositivos mecánicos conocidos como *homogeneizadores*, los cuales someten a los líquidos a una intensa agitación mecánica, que resulta en la ruptura de las gotas (Mootoosingh y Rousseau, 2006). Durante el proceso de homogeneización, la interfase entre las dos fases líquidas inmiscibles se deforma en tal extensión que comienzan a producirse gotas, en su mayoría, de gran tamaño (*homogeneización primaria*). Estas gotas deben deformarse y romperse para formar gotas de menor tamaño (*homogeneización secundaria*), por fuerzas de ruptura (**Figura II.2**). De esta manera, el área interfacial aumenta considerablemente, provocando que la energía libre superficial del sistema se incremente. Por ello, las gotas de un líquido en otro que es inmiscible tienden a adoptar una forma esférica para minimizar la energía libre interfacial (Palazolo, 2006; Ventureira, 2010).

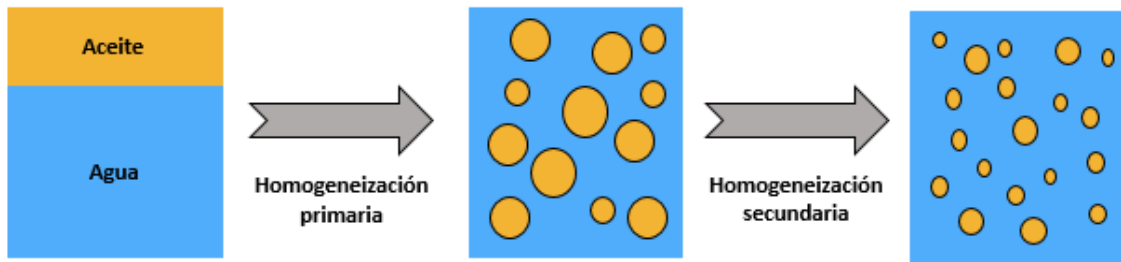


Figura II.2. Representación esquemática del proceso de homogeneización para una emulsión aceite en agua (O/W). La homogeneización primaria implica la conversión de dos fases separadas en una emulsión, mientras que en la homogeneización secundaria se produce una reducción del tamaño de gota de la emulsión preexistente

Los equipos que pueden utilizarse para homogeneizar emulsiones son:

- Agitadores rotatorios de alta velocidad
- Molinos coloidales
- Homogeneizadores de válvulas
- Homogeneizadores por ultrasonido

Agitadores rotatorios de alta velocidad: Estos agitadores son sistemas utilizados para la homogeneización directa de las fases O y W (Urban *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2011; Singh y Heldman, 2013). La rápida rotación del cabezal mezclador genera una combinación de los gradientes de velocidad longitudinal, rotacional y radial en los fluidos, lo que hace que los líquidos se mezclen y las gotas de mayor tamaño se rompan dando origen a otras más pequeñas (**Figura II.3**). Por lo general, estos mezcladores generan tamaños de gotas entre $\sim 2\text{-}10\ \mu\text{m}$. A nivel comercial, el equipo Ultraturrax® actúa como agitador rotatorio de alta velocidad.

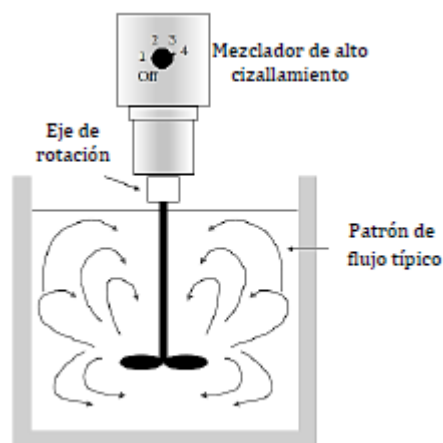


Figura II.3 Homogeneizador de alta velocidad - Ultraturrax (sistema cuchilla y rotor/estator) (McClements, 2016)

Molinos coloidales: Los molinos coloidales están basados en la formación de un flujo laminar de alta tensión de cizallamiento entre los discos del rotor y estator, lo que permite la reducción del tamaño de las gotas de emulsiones pre-existentes (homogeneización secundaria) o de media y alta viscosidad (Walstra, 1983; Schubert, 1997; Urban *et al.*, 2006). El tamaño de las gotas de aceite obtenidas con estos mezcladores varía entre 1 y 5 μm .

Homogeneizadores a válvulas: Los homogeneizadores a válvulas de alta presión son más eficaces en la reducción del tamaño de gota de una emulsión pre-existente, que en la formación de una emulsión a partir de los dos líquidos separados. Una emulsión pre-existente es forzada a pasar desde una cámara de presión, a través de una válvula mediante una bomba de alta presión. Una combinación de fuerzas disruptivas de cizalla, cavitación y flujo turbulento descomponen las gotas de mayor tamaño en gotas más pequeñas (Walstra y Smulder, 1988; Stang *et al.*, 2001). El tamaño de las gotas obtenidas está comprendido entre 0.1 y 2 μm .

Homogeneizadores por ultrasonido: Los homogeneizadores por ultrasonido son adecuados para la preparación de pequeños volúmenes de emulsiones y se utilizan principalmente en laboratorios de investigación. Este tipo de homogeneizador emplea ondas de ultrasonido de alta intensidad, que generan gradientes de presión y de cizallamiento, provocando la disrupción de las gotas hasta tamaños de $\sim 0.1 \mu\text{m}$ (Leong *et al.*, 2011).

II.2.1.2. Tecnología de Microfluídica

En la mayor parte de los métodos convencionales utilizados para preparar emulsiones, las gotas son generadas mediante agitación manual o mecánica. Sin embargo, las gotas no son formadas de manera uniforme ni pueden ser controladas con precisión. De esta manera, se obtienen emulsiones formadas por gotas altamente dispersas y de diferentes tamaños. Es por esto que se han desarrollado y optimizado varios métodos de emulsificación, tales como la emulsificación por microcanales (Kawakatsu *et al.*, 1997; Gañán-Calvo, 1998) para obtener un mejor control sobre el

tamaño y la polidispersión de las gotas. Entre la emulsificación por microcanales se encuentra la microfluidica.

La **microfluídica** se define como la tecnología de procesamiento y manipulación de fluidos en el rango de los microlitros (Chung *et al.*, 2008). Los dispositivos microfluídicos ofrecen una ruta alternativa y versátil para obtener emulsiones. A diferencia de los métodos de emulsificación en masa, una emulsión en un dispositivo microfluídico permite la formulación de una gota a la vez, dando como resultado **emulsiones monodispersas**. Una de las características más atractivas de las técnicas basadas en la microfluídica es que permiten la formulación de emulsiones simples, dobles, triples e incluso superiores, donde el tamaño y el número de las gotas encapsuladas pueden ser manipuladas con mayor precisión (Utada *et al.*, 2005, Chu *et al.*, 2007). Además, estas emulsiones son útiles en diversas aplicaciones, tales como la formulación de vesículas monodispersas, partículas con diferentes estructuras internas, la incorporación de materiales específicos con precisión dentro de emulsiones, entre otras.

La microfluídica ofrece una herramienta invaluable en la investigación de sistemas celulares complejos, ya que los dispositivos microfluídicos poseen dimensiones micrométricas comparables con el tamaño de las células (Niu y de Mello, 2012). Con respecto a la fabricación de dispositivos microfluídicos, los polímeros son los materiales más utilizados, debido a la facilidad, flexibilidad y menor costo que otros materiales (*i.e.*, silicio, vidrio) (Tsao, 2016).

En la actualidad, el polidimetilsiloxano (PDMS), que forma parte de la familia de polímeros de siliconas, constituye uno de los materiales más utilizados en los dispositivos microfluídicos. Las propiedades más importantes del PDMS son su permeabilidad a los gases (Lamberti *et al.*, 2014; Firpo *et al.*, 2015) y su biocompatibilidad.

La encapsulación por microfluídica presenta las siguientes ventajas:

- **Reducción del tamaño:** se reduce el tamaño del sistema al trabajar dispositivos microfluídicos que poseen dimensiones micrométricas, evitando el uso de grandes espacios de trabajo.
- **Portabilidad:** permite un fácil transporte de los dispositivos desde el lugar de trabajo al lugar de análisis, sin perder las propiedades del fluido.

- **Eficacia:** ofrece una mayor velocidad de análisis, mayor sensibilidad, y mayor efectividad debido a los tiempos de respuesta cortos.
- **Costo:** menores costos de fabricación.

La **fotolitografía** es una técnica muy utilizada en la fabricación de dispositivos microfluídicos (*chips*). Esta técnica consiste en depositar una capa de resina fotosintética sobre un sustrato y hacer pasar un haz de luz ultravioleta (UV) a través de una cámara con el diseño del dispositivo. Esta capa, con el dispositivo microfluídico impreso, se puede utilizar como molde para agregar el sustrato que formará la estructura del dispositivo.

El sustrato es el PDMS, que como ya se mencionó anteriormente, es un polímero con las ventajas de ser biocompatible, ópticamente transparente, permeable a los gases, buen aislante eléctrico y estable mecánicamente (Lamberti *et al.*, 2014; Firpo *et al.*, 2015; Wyżkiewicz *et al.*, 2007). Para la formación del dispositivo, se debe mezclar el polímero PDMS (SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Base) con un agente curante (SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Curing Agent) en una relación 10:1, y una vez obtenido, se lo adiciona al molde con el diseño a replicar. Una vez gelificado el polímero, el molde es extraído y sellado sobre un material como el vidrio (**Figura II.4**). Las desventajas de esta técnica son: la necesidad de instrumental sofisticado, condiciones de sala blanca (sala especialmente diseñada para obtener bajos niveles de contaminación) y personal calificado.

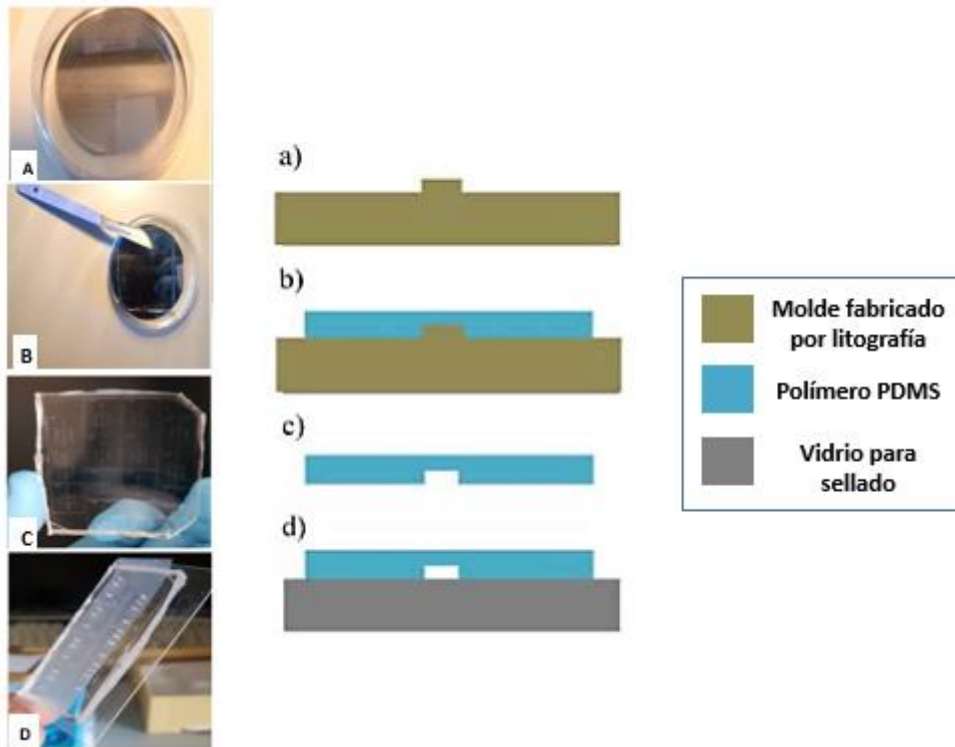


Figura II.4. Representación esquemática de la fabricación de dispositivos microfluídicos. a). Molde con la impresión por litografía del dispositivo; b). Polímero PDMS sobre molde; c). PDMS solidificado y libre del molde; d). Dispositivo microfluídico sellado al vidrio.

II. 2.1.3. Estabilidad de las emulsiones

La **estabilidad en una emulsión** se refiere a la capacidad de la misma para resistir cambios en sus propiedades a través del tiempo. De esta manera, cuanto más estable es una emulsión, más lento será el cambio en sus propiedades a través del tiempo (McClements, 1999). El siguiente ejemplo explica claramente el concepto de estabilidad de una emulsión. Si el agua y el aceite puros fueran agitados conjuntamente, se formaría una emulsión de manera temporal, ya que el sistema evolucionaría rápidamente hacia dos fases separadas (emulsión inestable). Esto se debe a que la energía de activación entre el estado emulsionado y el no emulsionado es muy pequeña. Por ello, para crear una emulsión cinéticamente estable durante un período razonablemente largo, es necesaria la presencia de un **agente emulsificante**, que dé lugar a una energía de activación lo suficientemente elevada como para evitar la desestabilización de la emulsión (Bengoechea Ruiz, 2006).

Muchas fuerzas actúan en las emulsiones al momento de formarse, entre las que se puede mencionar:

- Movimiento *browniano*,
- Fuerzas gravitacionales,
- Fuerzas hidrodinámicas,
- Interacciones de van der Waals,
- Interacciones hidrofóbicas,
- Fuerzas electrostáticas entre partículas,
- Interacciones estéricas.

El cambio de energía libre asociado a la formación de una emulsión indica si el proceso es termodinámicamente desfavorable o no. Sin embargo, no da indicación alguna sobre la velocidad a la cual las propiedades de la emulsión cambian con el tiempo (estabilidad cinética), ni sobre los mecanismos responsables de estos cambios (McClements, 2015). La estabilidad cinética de las emulsiones se atribuye a la naturaleza dinámica de estos sistemas. Las gotas de una emulsión, lejos de permanecer estáticas, están en continuo movimiento y colisionan unas con otras debido al movimiento browniano, la gravedad o fuerzas externas aplicadas. La naturaleza de las interacciones coloidales entre las gotas de la emulsión determinará la fusión o repulsión de las mismas luego de una colisión, y por consiguiente, la cinética de la emulsión. (McClements, 2015).

Una emulsión puede desestabilizarse a través de diferentes procesos fisicoquímicos. La desestabilización física consiste en una alteración en la distribución espacial o en la organización estructural de las moléculas. El cremado, floculación, coalescencia, inversión de fases o maduración de Ostwald constituyen ejemplos de la desestabilización física de emulsiones (**Figura II.5**). Por su parte, la oxidación y la hidrólisis química son ejemplos de desestabilización química. Para que una emulsión sea cinéticamente estable en función del tiempo, debe tener una energía de activación significativamente mayor que la energía térmica del sistema (Ventureira, 2010).

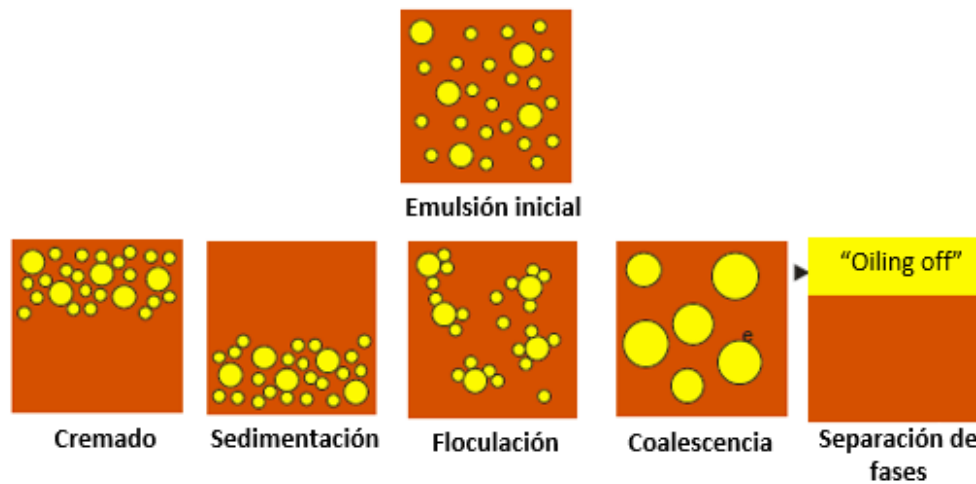


Figura II.5. Distintas desestabilizaciones que pueden ocurrir en una emulsión O/W. (Wagner, 2000)

Cremado/sedimentación (Separación gravitacional): En general, las gotas (fase dispersa) de una emulsión tienen diferente densidad que el líquido que actúa como fase continua, por lo que existe una fuerza gravitacional neta sobre las mismas. Si las gotas tienen una menor densidad que la fase continua, tenderán a ascender. Este proceso, conocido como **cremado**, ocurre en las emulsiones O/W. En contraste, si las gotas tienen una mayor densidad que la fase continua, tenderán a descender, conociéndose el proceso como **sedimentación**. Éste es el caso de las emulsiones W/O (Walstra, 1996). De acuerdo con la ley de Stokes, la velocidad de cremado en una emulsión es directamente proporcional al tamaño de la gota de la fase dispersa y a la diferencia de densidades de las fases dispersa y continua, e inversamente proporcional a la viscosidad de la fase continua (McClements, 1999).

Floculación: Es el proceso en el cual dos o más gotas se unen para formar un agregado (flóculo) en el cual cada una de ellas retiene su identidad (no se fusionan), llevando a una disminución en el número de partículas presentes en la emulsión. Dicho proceso puede ser reversible o irreversible, de acuerdo a las fuerzas que mantienen unidas a las gotas. Existen diversos mecanismos que pueden provocar el encuentro de dos partículas, tales como el movimiento *browniano*, la separación gravitacional y los esfuerzos de cizalla que se producen durante el flujo de la emulsión en las etapas de procesamiento o transporte (Melik y Fogler, 1988; McClements, 1999).

Coalescencia: Es un proceso irreversible por el cual dos o más gotas se unen entre sí para formar una única gota de mayor tamaño, lo que conduce a la reducción del área interfacial. La coalescencia es el principal mecanismo por el que una emulsión se mueve hacia su estado termodinámico más estable, ya que disminuye el área de contacto entre las fases W y O. La ocurrencia de este proceso de desestabilización depende de la frecuencia, la energía y la eficiencia de colisión entre las gotas, así como de la resistencia y la viscoelasticidad de la película que rodea a las mismas. La coalescencia produce una desestabilización más rápida de la emulsión, ya que aumenta el tamaño de partícula. En emulsiones O/W, la coalescencia conduce a la formación de una capa oleosa en la parte superior de la emulsión (*oiling off*), mientras que en emulsiones W/O conduce a la acumulación de agua en la parte inferior del sistema (McClements, 1999).

Maduración de Ostwald: Es el proceso mediante el cual las gotas de mayor tamaño crecen a expensas de otras más pequeñas, debido al transporte de masa de la fase dispersa desde una gota a otra a través de la fase continua (Kabalnov y Shchukin, 1992; Taylor, 1995). En contraste con lo que sucede con otros procesos de desestabilización, la velocidad a la que se produce la maduración de Ostwald aumenta a medida que disminuye el tamaño de gota (Kabalnov y Shchukin, 1992). Sin embargo, es importante considerar que un aumento en el tamaño de gota está asociado a una aceleración de otros procesos de desestabilización, tales como el cremado.

Inversión de fases: Es el proceso por el que un sistema pasa de ser una emulsión O/W a una W/O o viceversa. Se puede producir debido a una elevada fracción volumétrica de la fase dispersa, por efecto de trabajo mecánico o de la temperatura (Campbell y *et al.*, 1996; McClements, 1999).

II.2.1.4. Agentes emulsificantes

Proteínas, polisacáridos, lipoproteínas, glicolípidos, lípidos polares y otras macromoléculas han sido reconocidos como efectivos emulsificantes, tanto en coloides alimentarios naturales como en productos desarrollados por el hombre (Garti, 1999). Algunos de estos agentes poseen diversas propiedades funcionales y desempeñan un

papel importante en la calidad alimentaria y la estabilidad a largo plazo. Los emulsificantes actúan en sistemas de más de una fase de dos maneras principales:

- permitiendo que se combinen dos fases inmiscibles, dando lugar a un sistema casi homogéneo que puede ser estable durante períodos prolongados.
- modificando el comportamiento de la fase continua de un producto alimenticio para proporcionarle un beneficio específico (como por ejemplo el uso de lecitina en chocolate, que reduce la viscosidad del producto y mejora la manipulación y el procesamiento).

Para que una emulsión sea estable en el tiempo, es necesaria la presencia de un emulsificante. Los emulsificantes suelen ser compuestos anfifílicos (de Castro Santana *et al.*, 2012), es decir que son simultáneamente hidro y lipofílicos. Esta característica provoca su migración a la interfase agua-lípido, favoreciendo la formación de la emulsión y, una vez formada, aumentando su estabilidad durante su uso o almacenamiento (Luan *et al.*, 2009).

En cuanto a su masa, los emulsificantes suelen clasificarse en dos categorías: los emulsificantes de bajo peso molecular (*i.e.*, glicolípidos y ácidos grasos) y los de alto peso molecular (*i.e.*, polisacáridos y proteínas) (Kralova y Sjöblom, 2009).

2.1.4.1. Caseína y lecitina como emulsificantes

Muchas **proteínas** son tensioactivas y pueden ser utilizadas como emulsionantes debido a su capacidad para facilitar la formación y estabilizar *emulsiones* (Norde, 2003). Resultan componentes particularmente atractivos como emulsificantes dado que son de origen natural, no tóxicos y se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza (Harnsilawat *et al.*, 2006).

Las proteínas se adsorben sobre la superficie de las gotas de aceite recién formadas y facilitan su ruptura, ya que disminuyen la tensión superficial. Además, dan lugar a interacciones repulsivas (estéricas y electrostáticas) entre las gotas de aceite, generando una membrana interfacial que estabiliza las emulsiones frente a fenómenos de floculación y coalescencia durante el almacenamiento a largo plazo (Wilde *et al.*, 2004).

Las **caseínas** constituyen una familia de fosfoproteínas (α_{S1} , α_{S2} , β) que representa aproximadamente el 80% de las proteínas de la leche de vaca (Lopes *et al.*, 2007). Son

relativamente solubles en agua, donde se estructuran formando micelas heterogéneas (en composición y en tamaño), con una gran polidispersión, bajo empaquetamiento y alta porosidad (Hussain *et al.*, 2011). Las propiedades funcionales más importantes de las caseínas incluyen su capacidad de unir moléculas de agua, su poder emulsificante, su capacidad de espumado y batido, su capacidad para formar geles y sus propiedades nutricionales (Singh, 2010). El caseinato de sodio es el producto comercial más utilizado de las proteínas de leche (Dickinson, 2010). Las excelentes propiedades que presenta el caseinato de sodio como estabilizante de emulsiones pueden atribuirse al carácter de polielectrolito anfifílico que presentan los dos principales monómeros de caseína, α_{s1} y β -caseína, que constituyen aproximadamente el 75% de la caseína total en la leche (Dickinson, 1989).

Por su parte, la principal función de la **lecitina** en alimentos es como emulsionante (van Nieuwenhuyzen, y Szuhaj, 1998). La lecitina se obtiene como un subproducto del refinado del aceite de soja y de otros aceites. También se encuentra en la yema de huevo, y es un componente importante de las células de todos los organismos vivos, incluido el hombre. La lecitina comercial está formada por una mezcla de diferentes sustancias, la mayor parte de las cuales (fosfolípidos) tienen una acción emulsionante (Rydhag y Wilton, 1981; Kumar y Katare, 2005). Esta función es muy importante en tecnología de alimentos. Así, la lecitina se utiliza en todo el mundo como emulsionante, principalmente en la industria del chocolate, en repostería, pastelería, fabricación de galletas, entre las aplicaciones más importante. Además, es considerada como un aditivo seguro (Younes *et al.*, 2020, EFSA).

II.2.2. Encapsulación *Layer-by-Layer* (LbL) (capa por capa)

La técnica de encapsulación LbL consiste en la deposición alternada de polímeros con carga opuesta sobre sistemas con carga superficial, tales como compuestos bioactivos o microorganismos. Las ventajas de esta técnica son su versatilidad y simplicidad, ya que con materiales de laboratorio sencillos y sin necesidad de equipos sofisticados es posible formar estructuras complejas de forma reproducible y con alta estabilidad (Ruano Aldea, 2013; Anselmo *et al.*, 2016).

La adsorción alternada de capas con cargas catiónicas o aniónicas sobre superficies macroscópicas cargadas da lugar a la inversión de la carga superficial y a la formación de

una estructura de multicapas (Decher y Schmitt, 1992). El espesor de la multicapa de polielectrolitos y las propiedades fisicoquímicas de la cápsula están determinadas por parámetros como el pH, fuerza iónica, temperatura, los cuales pueden controlarse ajustando las condiciones experimentales (Voigt *et al.*, 2002).

La técnica LbL ha sido utilizada para encapsular diferentes sistemas y materiales, tales como nanopartículas, bacterias, cristales, proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y una amplia variedad de materiales funcionales (Ariga *at al.*, 2010; Becker *et al.*, 2010; Qiu *et al.*, 2001; Quintana *et al.*, 2017b). En general, las interacción entre las capas cargadas (positivas y negativas) se dan a través de interacciones electrostáticas (Schlenoff y Dubas, 2001; Larsson *et al.*, 2001). Sin embargo, existen otras interacciones que pueden actuar en la unión de las capas (*i.e.*, puentes de hidrógeno, uniones covalentes, entre otros) (Peyratout y Daehne, 2004; Schneider y Decher, 2008).

II.2.2.1. Deposición de las capas

El procedimiento básico consiste en la deposición de una primera capa de polielectrolito sobre la superficie del sustrato a encapsular en medios acuosos. Luego de la incorporación de cada capa, se necesita un tiempo de reposo para que las capas interactúen con el sistema a encapsular. Posteriormente, son necesarias etapas de centrifugación y lavado de las cápsulas para eliminar el exceso de polielectrolitos. **(Figura II.6)**. Luego de los procesos de lavado, se puede depositar la siguiente capa y el proceso se repite en forma secuencial, hasta obtener una cápsula del espesor deseado (Bagaria y Wong, 2011).

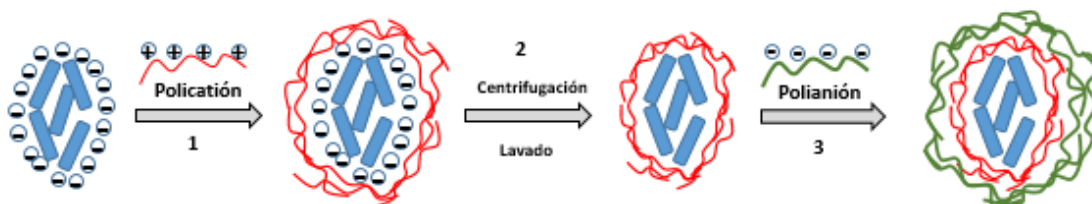


Figura II.6. Esquema de deposición de las diferentes capas sobre micropartículas. Las etapas 1 y 3 consisten en la deposición de las capas formadas por polielectrolitos cargados positiva y negativamente; la etapa 2 es el proceso de centrifugación y lavado

Al momento de preparar las soluciones de polielectrolitos debe considerarse que los polielectrolitos catiónicos y aniónicos deben tener siempre la misma fuerza iónica y

concentración (Jomaa y Schneloff, 2005), ya que polielectrolitos con diferente fuerza iónica pueden dar lugar a diferentes tipos de crecimiento de las capas (Schönhoff, 2001).

La primera capa es la que mayor influencia tiene sobre el sistema encapsulado, pero a medida que el número de capas aumenta, el crecimiento de la cápsula se vuelve independiente del sistema utilizado (Caruso *et al.*, 1998; Sukhorukov *et al.*, 1998). Si bien las interacciones electrostáticas son las que gobiernan la interacción entre capas de carga opuesta, otras interacciones como las de van der Waals, ácido-base o puentes de hidrógeno pueden contribuir favorablemente (Schlenoff y Dubas, 2001; Larsson *et al.*, 2001).

II.2.2.2. Polielectrolitos

Una gran variedad de moléculas de interés biológico (proteínas, DNA) son polielectrolitos. Existen además polielectrolitos sintéticos, ampliamente usados en aplicaciones comerciales como aditivos en productos cosméticos (agentes espesantes y modificadores reológicos), adhesivos, estabilizantes para suspensiones coloidales, tratamiento de aguas, floculantes y otros (Cortez, 2011).

Los polielectrolitos se clasifican en **fuertes** o **débiles** de acuerdo a su comportamiento ácido-base. En los polielectrolitos fuertes la carga de la molécula no depende del pH de la solución. En los polielectrolitos débiles, los grupos cargados se hallan en equilibrio ácido-base, y por lo tanto, su grado de ionización dependerá del pH. En este caso, el pKa o el pKb aparentes indican el pH en el cual la mitad de los grupos se hallan disociados (Choi y Rubner, 2005).

Los polielectrolitos se caracterizan por ser macromoléculas versátiles, capaces de adoptar un gran número de conformaciones. En solución, los polielectrolitos adoptan una conformación de ovillo que maximiza la entropía conformacional (Hill, 1986). Por otro lado, un polielectrolito fuertemente cargado buscará disminuir las repulsiones entre cargas, dependiendo de la concentración de contraiones y por lo tanto presentará en solución una conformación más extendida. La conformación de un polielectrolito real en una solución diluida estará determinada por el balance entre diversas interacciones tales como las fuerzas electrostáticas, las fuerzas de van der Waals, los puentes de hidrógeno, la concentración de contraiones (Manning, 1969), los impedimentos estéricos y los equilibrios químicos (para polielectrolitos débiles y/o redox).

II.2.2.2.1. Polielectrolitos naturales

Los polielectrolitos naturales, provenientes directamente del reino animal o vegetal, presentan variadas propiedades y usos, siendo los más importantes en áreas farmacéuticas, agrícolas, alimenticia y textil. En los últimos años, los polímeros naturales han adquirido gran importancia en el área biomédica, especialmente en el desarrollo de nuevas terapias celulares (Cabané *et al.*, 2011), donde se utilizan para proteger células en cápsulas semipermeables o como agentes encapsulantes y transportadores de diversos fármacos y principios activos. Entre los polímeros naturales existentes y utilizados, dos destacan por sus características, usos y su potencial: el quitosano y el alginato.

Quitosano. El quitosano es el principal derivado de la quitina, que es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, luego de la celulosa. El quitosano es un biopolímero natural, obtenido principalmente a partir del exoesqueleto de diferentes insectos, crustáceos y hongos y del endoesqueleto del calamar (Centes *et al.*, 2007; De la Paz *et al.*, 2012; Huerta *et al.*, 2012). El quitosano es un biopolímero obtenido generalmente mediante un proceso de desacetilación alcalina de la quitina. Como el quitosano está cargado positivamente a valores de pH bajos (por debajo de su pKa), se asocia espontáneamente con los poli-iones cargados negativamente (poli-anión) en solución para formar complejos polielectrolitos. (Hamman, 2010).

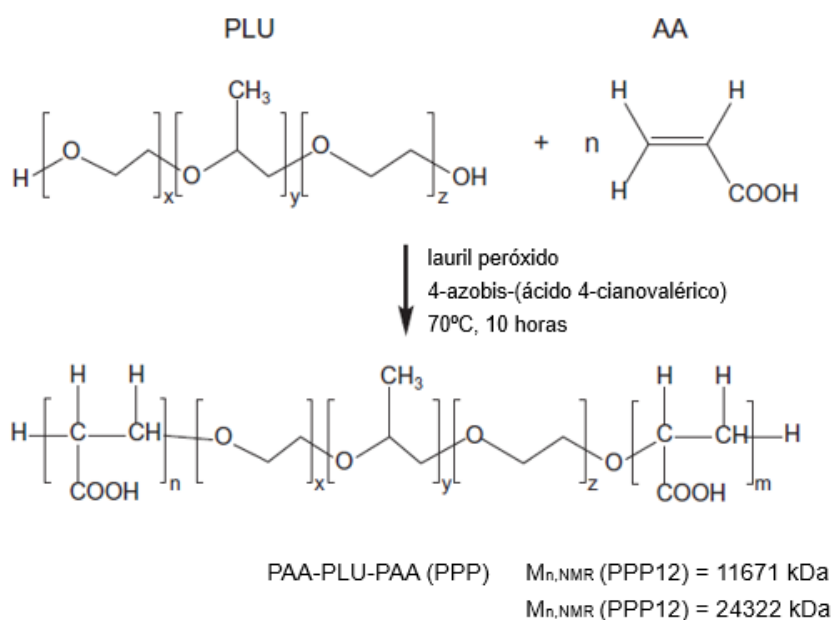
Alginato. Los alginatos son sales copoliméricas de ácido algínico, un polisacárido natural formado por cadenas lineales constituidas por dos unidades repetitivas agrupadas en bloques derivadas de los ácidos α -L-gulurónico (G) y β -D-manurónico (M) unidos por enlaces α y β (1 \rightarrow 4) glucosídicos, proveniente de especies de algas marinas pardas como: *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pirifera*.

Una de las principales características del alginato es su naturaleza aniónica a pH altos (por arriba de su pka), es decir, presenta numerosos grupos químicos cargados negativamente, los cuales le permiten formar geles en presencia de cationes divalentes como: calcio, bario, estroncio y hierro. En los últimos años, los alginatos han sido estudiados en diferentes campos de aplicación, tales como sistemas para la liberación de fármacos, remoción de metales pesados y biomineralización de carbonato de calcio, entre otros (Neira-Carrillo *et al.*, 2013).

II.2.2.2. Polielectrolitos funcionalizados

En la actualidad, existe un creciente interés en los polielectrolitos sintéticos biocompatibles, que contengan cadenas funcionalizadas. La industria busca polielectrolitos que permitan la formación de estructuras más organizadas. Para conseguir este objetivo se suele introducir en los polielectrolitos un número controlado de cadenas modificadas con grupos funcionales. (Ruano-Aldea, 2013).

PPP es un copolímero formado por ácido acrílico (PAA) y ácido plurónico (P) [PAA-PLU-PAA]. El ácido acrílico es un ácido biocompatible y un polielectrolito aniónico biodegradable (pKa: 4.95), ampliamente utilizado en formulaciones farmacéuticas y cosméticas (Seki y Tirrell, 1984), que precipita a pH bajo, y absorbe agua y se disuelve a pH alto. Las propiedades hidrofóbicas del ácido plurónico y el comportamiento frente al pH del ácido acrílico le otorgaron características particulares al copolímero PPP (**Esquema II.1**), que demostró ser eficiente para la liberación controlada de fármacos cuyo *target* es el intestino (Barreiro-Iglesias *et al.*, 2005; Kabanov *et al.*, 2002).



Esquema II.1. Esquema de reacción para la síntesis de PAA-PLU-PAA (PPP). x = número de unidades de óxido de etileno, y = número de unidades O-CH₃-CH₂, z = número de unidades de óxido de propileno, m, n = número de unidades de ácido acrílico.

Objetivos específicos

Parte I

- Utilizar el aceite de okara para la formulación de emulsiones simples (O/W) para encapsular *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114.
- Evaluar las propiedades de las emulsiones y su efecto protector sobre *L. plantarum* CIDCA 83114 sometida a procesos de deshidratación y almacenamiento.

Parte II

- Utilizar la técnica LbL para encapsular *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 y *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 con capas de quitosano como polielectrolito catiónico y un copolímero PPP como polielectrolito aniónico.
- Evaluar el efecto protector de dichos polielectrolitos sobre los microorganismos sometidos a procesos de deshidratación y digestión gastro-intestinal *in vitro*.
- Utilizar el aceite de okara y el polímero PPP para la formulación de emulsiones simples (W/O) para encapsular *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 mediante la técnica de microfluídica.
- Evaluar las características de las emulsiones obtenidas y el efecto protector del PPP sobre *L. plantarum* CIDCA 83114 en la digestión gastro-intestinal *in vitro*.

Uso del aceite de okara para la formulación de emulsiones estables

PARTE 1

II.2.1. MATERIALES Y METODOS

II.2.1.1. Obtención y caracterización del aceite de okara

El aceite de okara se obtuvo por medio del método Soxhlet (AOAC, 1995), utilizando como solvente de extracción éter de petróleo:éter etílico en una relación 1:1. Se pesaron aproximadamente 35 g de okara liofilizado y triturado y se lo colocó en cartuchos de papel de filtro, que luego se cerró completamente para evitar pérdida de material. Se colocó la mezcla de solventes en el balón de destilación previamente tarado. Una vez armado el dispositivo de Soxhlet, se lo colocó sobre una placa eléctrica, se calentó el solvente hasta ebullición, y se llenó la cámara donde se encontraba el cartucho por goteo. El sistema estuvo en funcionamiento durante 6 horas aproximadamente. Luego se dejó enfriar el sistema, se retiró el cartucho y se repitió el proceso de extracción. Finalmente se colocó el balón con el aceite extraído en estufa a 37°C para completar la eliminación del solvente, hasta peso constante.

La composición de ácidos grasos del aceite se analizó de acuerdo con el método estándar IUPAC 2.302 (IUPAC, 1992). Para ello, los lípidos fueron convertidos a sus ésteres metilados (derivatización), y analizados por cromatografía gaseosa, tal como se indicó en la sección Materiales y Métodos del capítulo 1 (sección I.2.8).

II.2.1.2. Preparación de las emulsiones aceite/agua (O/W)

Una vez reactivados (sección I.2.6) *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 fueron crecidos a 37°C, en medio MRS, hasta alcanzar la fase estacionaria (24 horas). Luego fueron cosechados por centrifugación a 8000 g durante 10 minutos, los sobrenadantes descartados y los pellets, lavados dos veces con PBS. Los pellets fueron resuspendidos en caseinato de sodio 6% p/v (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA), el cual se usó como agente emulsionante (fase acuosa, W).

Como fase oleosa (O) se utilizó el aceite de okara, en diferentes proporciones (1.5, 2.0 y 3.0) con respecto al caseinato de sodio, que se mantuvo constante (6% p/v). De esta manera, se obtuvieron emulsiones O/W de diferentes proporciones: 1:4 (1.5/6) , 1:3 (2.0/6) y 1:2 (3.0/6), respectivamente.

El caseinato (que contenía los microorganismos) y el aceite de okara fueron homogenizados en un equipo Ultra Turrax T25 (IKA, Staufen im Breisgau, Alemania) durante 5 minutos a 13500 g. Como controles se utilizaron emulsiones O/W (proporción 1:4) sin bacterias.

II.2.1.3. Deshidratación de las emulsiones y almacenamiento

II.2.1.3.1. Liofilización

Se prepararon 100 mL de cada una de las proporciones de emulsiones con bacterias en fase estacionaria, se congelaron a -80°C durante 24 horas y luego se liofilizaron en un equipo Heto FD4 (Heto Lab Equipment, Dinamarca), durante 48 horas. Se usaron dos controles: las bacterias no encapsuladas resuspendidas en PBS, y emulsiones 1:4 O/W liofilizadas sin bacterias.

II.2.1.3.2. Secado en *spray*

Se prepararon 500 mL de las emulsiones O/W en sus diferentes proporciones, conteniendo las bacterias en fase estacionaria. Las preparaciones se deshidrataron usando un secador *spray* de laboratorio (Büchi B290, Flawil, Suiza) a una temperatura de entrada de aire constante de 145°C y una temperatura de salida de 60°C. Como controles se utilizaron cultivos en caldo MRS, neutralizados y resuspendidos en PBS (bacterias no encapsuladas) y emulsiones 1:4 O/W secadas en *spray* en ausencia de microorganismos.

II.2.1.3.3. Almacenamiento

Antes y después de los procesos de liofilización y secado en *spray*, se realizaron recuentos en placa para cada una de las emulsiones, tal como se explicó en el capítulo 1. Los resultados se expresaron como log UFC/g.

Las bacterias deshidratadas por ambos métodos se almacenaron durante 90 días a 4°C en desecadores que contenían silica gel, y se hicieron recuentos cada 15 días. Los resultados se expresaron como log N/N₀, donde N₀ es el recuento a tiempo 0 y N, el recuento a tiempo *t*.

II.2.1.4. Observaciones microscópicas

II.2.1.4.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de las microcápsulas se estudió mediante microscopía electrónica de barrido. Las emulsiones liofilizadas y secadas en *spray* se congelaron en nitrógeno líquido y se cortaron utilizando un bisturí. Las muestras se fijaron sobre placas de bronce y se observaron con un microscopio electrónico Quanta 200 modelo FEI (Países Bajos). No se utilizó ningún recubrimiento de metal o carbono. Se trabajó a baja presión y con un voltaje de 12.5 kV.

II.2.1.4.2. Análisis por microscopía láser confocal de barrido

Para observar simultáneamente las bacterias y las emulsiones se utilizaron dos marcadores: el TO-PRO-3 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) y el Rojo Nilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). El TO-PRO-3 es un marcador de núcleo, que da fluorescencia roja, y contra-tinción cromosómica, que no es capaz de atravesar células vivas pero ingresa en las membranas dañadas (características de las células muertas), por lo que es un indicador de células muertas. El colorante TO-PRO-3, compuesto por carbocianina, emite una fluorescencia de color rojo oscuro con excitación a 642 nm y emisión a 661 nm. Por otra parte, el rojo Nilo se utilizó para teñir las emulsiones O/W. Se preparó una solución de tinción de rojo Nilo al 0.01% p/p disolviendo 0.001 g del colorante en 10 mL de acetona y se guardó en oscuridad a 20°C. El marcador rojo Nilo emite fluorescencia verde con excitación a 510-560 nm y emisión a 590 nm.

Las emulsiones liofilizadas y secadas en *spray* se resuspendieron en agua destilada desionizada, para alcanzar una concentración de 10^8 células/mL. Se agitaron en *vortex* hasta disolución total, se adicionó 1% v/v de rojo Nilo, y se incubó a 37°C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se agregó el mismo volumen de metanol (50% v/v) y se incubó a 37°C durante 5 minutos. Finalmente, se agregó 1 μ L de TO-PRO-3 (concentración final: 0.8 μ M) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y se incubó a 37°C durante 5 minutos más. Los preparados se observaron en un microscopio láser confocal de barrido (Leica TCS SP5 Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con láseres de Argón y HeNe. Los microorganismos teñidos se observaron utilizando una longitud de onda de excitación de 642 nm.

II.2.1.5. Caracterización de las emulsiones deshidratadas

II.2.1.5.1. Contenido de humedad

Se determinó el contenido de humedad de las muestras liofilizadas y secadas en *spray* por pérdida de peso en una estufa de vacío a 70°C hasta peso constante (AOAC 1980). Se utilizaron emulsiones deshidratadas sin bacterias como controles. Los resultados de humedad se expresaron en gramos de agua por 100 g de peso seco (ms).

II.2.1.5.2. Actividad de agua (a_w)

Las a_w de las emulsiones liofilizadas y secadas en *spray* se determinó en un equipo Aqualab (Aqualab, Model Series 3TE, USA). Se utilizaron cápsulas que no contenían bacterias como controles. El equipo fue calibrado utilizando soluciones salinas estándar proporcionadas por el fabricante.

II.2.1.5.3. Tamaño de partícula, índice de polidispersión (\mathfrak{D}) y potencial zeta (ζ)

Para todas las medidas se utilizaron emulsiones frescas y deshidratadas (liofilizadas y secadas en *spray*), haciendo diluciones seriadas de las muestras en PBS. Todas las mediciones se realizaron a 37°C usando un equipo Malvern Zetasizer (Nano-Z Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido).

Se determinó el tamaño de partícula de las emulsiones (frescas y deshidratadas) por la dispersión de luz dinámica (*light scattering*), utilizando el *software* Zetasizer 6.20.

El potencial ζ se determinó utilizando una combinación de técnicas de medición: electroforesis y velocimetría Doppler láser (electroforesis láser Doppler). Los valores de potencial ζ fueron proporcionados directamente por el equipo. Se obtuvo un valor medio de potencial ζ de al menos 20 determinaciones para cada muestra.

II.2.1.5.4. Ensayo acelerado de estabilidad oxidativa (Rancimat)

La estabilidad oxidativa de las emulsiones liofilizadas y secadas en *spray* se evaluó mediante un ensayo acelerado de estabilidad oxidativa, determinando el tiempo de inducción (ti) según AOAC Cd12-57 (Rancimat 743, Metrohm AG, Herisau, Suiza). Para ello, se pesó 1 g de cada muestra en el recipiente de reacción y se las sometió a una temperatura de 98°C, con burbujeo continuo de una corriente de aire a una velocidad de 20 L/hora. Los productos de oxidación de naturaleza volátil fueron transportados por dicha corriente de aire a la celda de medición donde se dispersaron en una solución de

muy baja conductividad (agua destilada). Las determinaciones se hicieron por duplicado. Como controles se utilizaron emulsiones 1:4 (O/W) deshidratadas sin bacterias.

II.2.1.5.5. Índice de peróxido

La oxidación de los lípidos se determinó a partir del valor del peróxido. El aceite se extrajo de acuerdo con Partanen *et al.* (2005). Se resuspendieron 0.5 g de emulsiones deshidratadas que contenían bacterias (en duplicado) en 5 mL de agua destilada y se agitaron hasta su completa resuspensión. Luego se pesaron 0.3 g de cada una de las suspensiones, se les agregó 1.5 mL de una mezcla de isooctano/isopropanol (3:1 v/v) (Merck, Darmstadt, Alemania) y se agitaron 3 veces en *vortex* durante 10 segundos. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 10000 *g* durante 5 minutos y se determinaron los valores de peróxido de la fase superior, de acuerdo a McClements (1999). Por otra parte se preparó el sustrato de reacción con sulfato ferroso 0.072M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), que se mezcló con 1 mL de cloruro de bario. Se centrifugó a 10000 *g* durante 5 minutos. Se tomó 1 mL de la fase superior y se lo mezcló con 1 mL de solución de tiocianato 3.94 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), generando de esta manera, el sustrato de reacción. Para las determinaciones, se mezclaron 2.8 mL de metanol/butanol (2:1 v/v) (Merck, Darmstadt, Alemania), 200 μ L de la fase superior de las muestras preparadas en una primera instancia y 30 μ L del sustrato de reacción. Las muestras se agitaron en *vortex* durante algunos segundos y se dejaron reposar durante 30 minutos en oscuridad. Se determinó la absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu, Kyoto, Japón). Las curvas estándar fueron realizadas con hidroperóxido de cumeno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Como controles se usaron emulsiones deshidratadas que no contenían microorganismos (O/W:1:4).

II.2.1.6. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado utilizando cultivos independientes. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para todos los ensayos, utilizando el programa estadístico InfoStat 2008 (Grupo Infostat/FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Ed. Brujas, Córdoba, Argentina). La comparación de medias se realizó utilizando el método de Tukey, y si $p < 0.05$, la diferencia se consideró estadísticamente significativa.

II.3.1. Resultados y discusión

II.3.1.1. Caracterización del aceite de okara

En este capítulo, se utilizó el aceite de okara (extraído en la fase de desengrasado del okara, y se lo utilizó como fase oleosa (O) junto con el caseinato de sodio (fase acuosa, W), para la formulación de emulsiones estables de aceite en agua (O/W). Dichas emulsiones fueron utilizadas para encapsular *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 y protegerlo durante los procesos de deshidratación (liofilización y secado en *spray*) y su posterior almacenamiento. La eficiencia de este tipo de encapsulación requiere de un análisis que considere no sólo la viabilidad de la bacteria encapsulada sino también la estabilidad del aceite.

Tabla II.1. Composición de ácidos grasos del aceite de okara (% del total de ácidos grasos)^a.

Ácidos Grasos	Aceite de Okara (%)
C16:0	11.57
C16:1	0.08
C18:0	4.43
C18:1 (n9)	20.04
C18:1 (n7)	1.30
C18:2 (n6)	54.61
C18:3 (n3)	7.97

^aDesviación estándar por debajo del 1% en todos los casos.

Los ácidos grasos C18:2 (n6) y C18:1 (n9) fueron los que se encontraron en mayor proporción, representando el 74.65% del total de los ácidos grasos en el aceite de okara. Además, se destaca la presencia de C18:3, que representó un 7.97% del total. De esta manera, los ácidos grasos mono y poliinsaturados constituyeron un 83.92% de los ácidos grasos. Los datos mostrados en la **Tabla II.1** fueron comparables a los informados por otros autores (Sawada *et al.*, 2014). Sawada *et al.* (2014) hicieron extracciones con etanol en diferentes condiciones pero en todos los casos los grupos que se encontraban en mayor proporción fueron C18:2 (n6) y C18:1 (n9), con porcentajes de entre 76.05 y 77.99% del total de ácidos grasos presentes. Asimismo, el aceite de soja contiene porcentajes similares de C18:2 y C18:1 (74.87% sobre el total), de acuerdo a lo informado por Canacki (2005).

II.3.1.2. Observaciones microscópicas

En la **Figura II.7** se observan las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las emulsiones liofilizadas y secadas en *spray*. En la imágenes de las muestras liofilizadas se observan partículas dispersas y sin una distribución homogénea (**Figura II.7 AI**). Por el contrario, las muestras secadas en *spray*, dieron lugar a partículas más pequeñas, en mayor cantidad y dispersas de una manera más uniforme (**Figura II.7 BI**). Ying *et al.*, 2010 utilizaron aceite de girasol para encapsular *Lactobacillus rhamnosus*. Las emulsiones mostraron características similares a las observadas en este trabajo de tesis, ya que las muestras secadas en *spray* tuvieron una distribución más uniforme que las emulsiones liofilizadas, las cuales aparecieron en forma de fragmentos irregulares.

La microscopía confocal permitió la observación de los microorganismos teñidos con TO-PRO-3 (**Figura II.7 AII y BII, imágenes de la izquierda**) y las cápsulas teñidas con el marcador rojo Nilo (**Figura II.7 AII y BII, imágenes centrales**). La superposición de ambas imágenes permitió visualizar las cápsulas (en verde) y los microorganismos (en rojo) en una misma imagen (**Figura II.7 AII y BII, imágenes de la derecha**). Las dimensiones de las cápsulas que contenían bacterias, secadas en *spray*, fueron comparables a las de otros microorganismos encapsulados usando otro tipo de emulsionantes (*i.e.*, leche descremada o goma arábiga) (1000–2000 nm para los microorganismos y 5000 nm para emulsiones) (Zhang *et al.*, 2015), lo que puede ser importante a nivel tecnológico para su incorporación en productos alimenticios, ya que son emulsiones que presentan una mayor estabilidad, lo cual es importante en el transporte de ingredientes funcionales y en las características organolépticas de los productos (McClements y Weiss, 2005; Serdaroğlu *et al.*, 2015; Teo *et al.*, 2016; Alzorqi *et al.*, 2016).

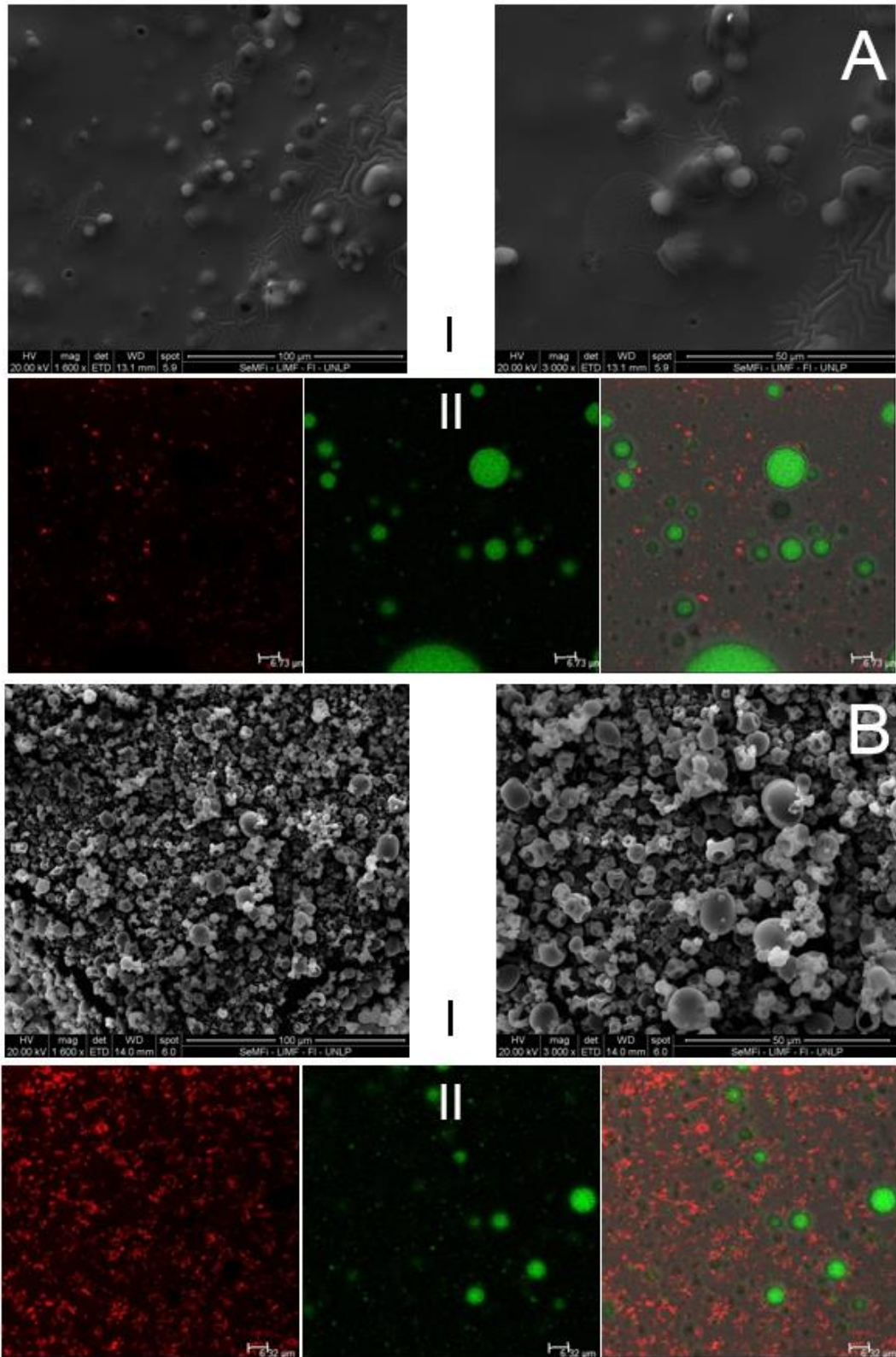


Figura II.7. Micrografías SEM de barrido y láser confocal de emulsiones deshidratadas que contienen microorganismos (O/W: 1:4). A: liofilización; B: secado en *spray*. I: imágenes SEM; II: Micrografías confocal de barrido: Imagen izquierda: fluorescencia roja (*L. plantarum* CIDCA 83114 marcado con TO-PRO-3), imagen del medio: fluorescencia verde (aceite marcado con rojo Nilo); imagen derecha: micrografías juntas que muestran ambas marcas.

II.3.1.3. Caracterización de las emulsiones

Las valores del contenido de humedad de las emulsionadas liofilizadas y secadas en *spray* estuvieron comprendidos entre 1.50 y 2.60 g/100 g bs, mientras que los controles que no tenían bacterias presentaron valores significativamente inferiores (0.50–1.00 g/100 g bs) (**Tabla II.2**).

Con respecto a la actividad de agua (a_w), las emulsiones liofilizadas presentaron valores significativamente menores que las emulsiones secadas en *spray*. La menor actividad de agua de las muestras liofilizadas fue comparable a la informada por otros autores (Ying *et al.*, 2010). Si bien Ying *et al.* (2010) usaron otro microorganismo y emulsionantes diferentes, las muestras liofilizadas mostraron valores menores de actividad de agua. No se observaron diferencias significativas entre las diferentes proporciones de emulsiones O/W utilizadas (1:2, 1:3, 1:4) (**Tabla II.2**).

Tabla II.2. Humedad y actividad de agua de las emulsiones liofilizadas y secadas en *spray*

Muestras	Humedad (g/100 g bs)	a_w
Liofilizadas		
O/W 1:2	1.51 ± 0.10 ^a	0.13 ± 0.04 ^A
O/W 1:3	1.60 ± 0.13 ^a	0.14 ± 0.03 ^A
O/W 1:4	2.26 ± 0.12 ^a	0.17 ± 0.05 ^A
O/W 1:4 (control)	0.50 ± 0.02 ^b	0.24 ± 0.07 ^B
Secadas en <i>spray</i>		
O/W 1:2	1.90 ± 0.10 ^{a'}	0.30 ± 0.05 ^{A'}
O/W 1:3	2.59 ± 0.19 ^{a'}	0.32 ± 0.05 ^{A'}
O/W 1:4	2.14 ± 0.15 ^{a'}	0.32 ± 0.05 ^{A'}
O/W 1:4 (control)	0.96 ± 0.09 ^{b'}	0.27 ± 0.01 ^{A'}

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

En la **Figura II.8** se puede observar el tamaño de partícula de las emulsiones O/W antes y después de liofilizarlas y secarlas en *spray*. Las emulsiones frescas fueron las que presentaron los valores menores y no se observaron diferencias significativas entre las diferentes relaciones O/W de las emulsiones (**Figura II.8**). El tamaño de partículas de las muestras secadas en *spray* aumentó hasta 1.7 veces con respecto a las emulsiones

frescas, y no se observaron diferencias significativas para las distintas O/W analizadas (**Figura II.8**). Las muestras secadas en *spray* presentaron un índice de polidispersión (\mathcal{D}) inferior a 0.300, dato que indica la homogeneidad de la población (**Tabla II.3**). Por el contrario, las muestras liofilizadas fueron las que mostraron los mayores tamaños de partícula (**Figura II.8**) y valores de \mathcal{D} por encima de 0.550 (**Tabla II.3**), lo que indica una mayor heterogeneidad. Para las emulsiones liofilizadas, la relación O/W 1:2 fue la que presentó los valores más elevados de \mathcal{D} (muestras más heterogéneas), seguidas de las relaciones O/W 1:3 y 1:4, lo que demuestra que cuanto mayor es el contenido de aceite, mayor el tamaño de partícula y mayor su heterogeneidad (**Figura II:8 y Tabla II.3**).

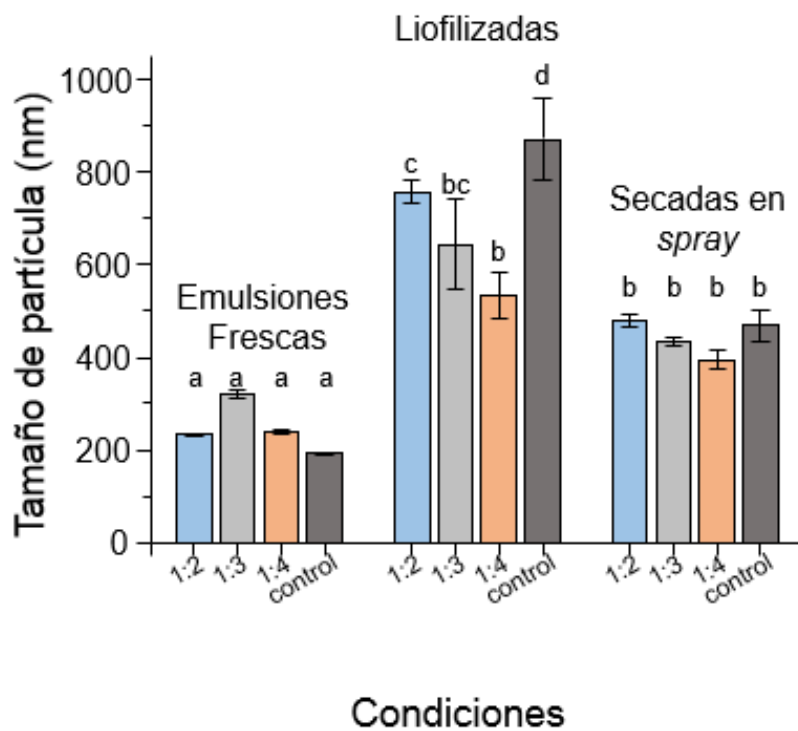


Figura II.8. Tamaño de partícula de las emulsiones O/W frescas, liofilizadas y secadas en *spray*. Controles: emulsiones deshidratadas sin bacterias (relación O/W: 1:4). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla II.3. Índice de polidispersión (\mathfrak{D}) de las emulsiones frescas y deshidratadas

Emulsiones	\mathfrak{D}
Frescas	
1:2	0.342±0.065 ^a
1:3	0.516±0.053 ^b
1:4	0.371±0.073 ^a
Control	C.317±0.048 ^a
Liofilizadas	
1:2	0.649±0.274 ^{a'}
1:3	0.650±0.163 ^{a'}
1:4	0.577±0.153 ^{a'}
Control	C.838±0.108 ^{b'}
Secadas en <i>spray</i>	
1:2	0.305±0.163 ^B
1:3	0.242±0.186 ^A
1:4	0.255±0.198 ^A
Control	C.545±0.099 ^B

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Cuando se quiere encapsular compuestos bioactivos para aplicaciones alimenticias, el tamaño de partícula es un factor crítico, que puede influir en los productos. Así, la presencia de partículas grandes puede dar lugar a texturas arenosas (*sandiness*), que afectan las propiedades sensoriales de los productos, limitando su aplicación en productos alimenticios (Walstra *et al.*, 2005). Por lo tanto, los tamaños de partícula deben ser lo más pequeños posible. En este capítulo, los tamaños de partícula de las emulsiones deshidratadas fueron más elevados que los de las recién preparadas (frescas) (**Figura 8.II**). Esto puede explicarse considerando que la eliminación de agua por deshidratación puede generar una cierta agregación de las partículas. Por otro lado, el tipo de proceso de deshidratación determinó claramente la estabilidad de las cápsulas obtenidas en términos de tamaño de partícula y \mathfrak{D} (**Figura II.8 y Tabla II.3**). Así, las emulsiones secadas en *spray* tuvieron tamaños y valores de \mathfrak{D} más bajos que las emulsiones liofilizadas. Ying *et al.* (2010) obtuvieron resultados similares, al formular emulsiones con aceite de girasol y aislado de proteína de suero para encapsular *Lactobacillus rhamnosus*, ya que observaron que el tamaño de partícula de emulsiones secadas en *spray* es menor que para emulsiones liofilizadas. Las imágenes obtenidas por

microscopía SEM y confocal fueron consistentes con estos resultados, mostrando que las muestras secadas en *spray* tuvieron una distribución homogénea, y no así las muestras liofilizadas (**Figura II.7**). La naturaleza del proceso de secado en *spray* permite explicar el menor tamaño de partícula en relación al de las muestras liofilizadas. Durante la etapa de atomización, las emulsiones entran en contacto directo con el aire caliente, y esto permite obtener gotas más pequeñas y mejores distribuciones de tamaño (Master, 1972; Sander y Penovic, 2014).

Por otra parte, es importante destacar que las emulsiones secadas en *spray* presentaron menores tamaños de partícula, lo cual da lugar a una mayor superficie de contacto, lo cual a su vez, facilita la interacción con el agua. Esto explica la mayor a_w de las emulsiones secadas en *spray* en comparación con las liofilizadas (**Tabla II.2**).

En la **Figura II.9** se presentan los resultados de potencial ζ para las emulsiones frescas y deshidratadas. Si bien no se observaron diferencias significativas entre los procesos de deshidratación (liofilización o secado en *spray*), las diferentes proporciones de emulsiones mostraron diferencias significativas (**Figura II.9**). La emulsión 1:2 (O/W) presentó los valores más negativos en todos los casos, seguidos de las proporciones 1:3 y 1:4 O/W, que presentaron valores de potencial ζ entre -34 y -36 mV. Estos resultados mostraron que a mayor cantidad de aceite en la emulsión, más negativa la carga superficial (**Figura II.9**). Además, los controles sin bacterias, preparados con la proporción 1:4 O/W fueron significativamente más negativos que la misma proporción con bacterias, indicando que podría existir una interacción entre las bacterias y el caseinato de sodio, que provocaría un cambio en la carga superficial de las emulsiones. Ly *et al.* (2008) estudiaron las interacciones entre dos cepas de *Lactobacillus lactis*, incorporadas en emulsiones que fueron estabilizadas con tres proteínas de la leche (caseinato de sodio, concentrado de proteína de suero y aislado de proteína de suero), a diferentes pH (entre 3 y 7). Los autores informaron la existencia de interacciones hidrofóbicas entre las bacterias y las gotas, en donde las bacterias eran absorbidas por las gotas y por las proteínas de la leche (Ly *et al.*, 2008). Es posible que a menores concentraciones de aceite, como es el caso de la emulsión 1:4 (O/W), las bacterias hayan interactuado de manera diferente con el caseinato de sodio, dando lugar a valores más positivos de potencial ζ .

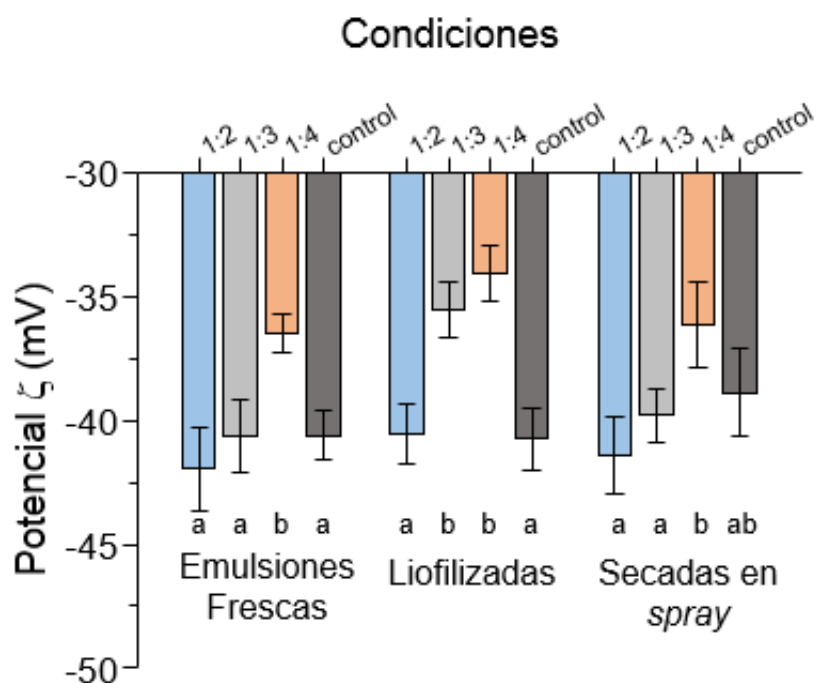


Figura II.9. Potencial ζ de las emulsiones O/W frescas, liofilizadas y secadas en *spray*. Controles: emulsiones deshidratadas sin bacterias (relación O/W: 1:4). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

II.3.1.4. Estabilidad de las emulsiones

En la **Figura II.10** se presentan los resultados sobre la estabilidad de las emulsiones liofilizadas y secadas en *spray*, determinados en función del tiempo de inducción y los valores de peróxido. Las muestras liofilizadas presentaron tiempos de inducción de entre 6 y 13 horas, y no se observaron diferencias significativas para las diferentes proporciones de emulsiones O/W (**Figura II.10 A**). Por el contrario, las emulsiones secadas en *spray* mostraron tiempos de inducción muy superiores a los de las liofilizadas. Para las relaciones 1:2 y 1:3 O/W se registraron valores de aproximadamente 30 horas. Por su parte, tanto las emulsiones 1:4 O/W como los controles (preparados con la misma relación O/W pero sin bacterias) tuvieron valores de alrededor de 80 horas.

Con respecto a los valores de peróxido, las emulsiones secadas en *spray* presentaron resultados significativamente más bajos que las muestras liofilizadas ($p < 0.05$) (**Figura II.10 B**), lo cual es consistente con la mayor estabilidad de las emulsiones secadas en *spray*.

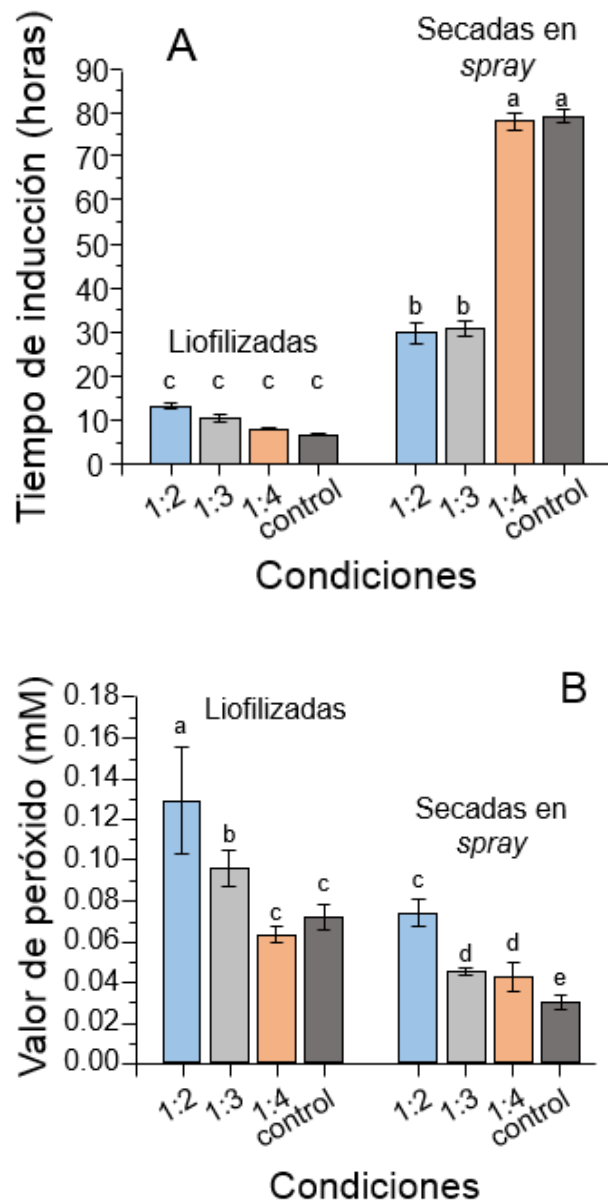


Figura II.10. A. Tiempos de inducción; y B. Valores de peróxido (mM) de emulsiones liofilizadas y secadas en *spray*. Controles: emulsiones deshidratadas sin bacterias (relación O/W: 1:4). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

La composición de ácidos grasos del aceite de okara podría explicar la estabilidad en las emulsiones deshidratadas (**Figura II.10, Tabla II.1**). Diferentes fases oleosas (aceite de canola, de sésamo o grasas lácteas) han sido utilizadas para la encapsulación de bacterias lácticas (Hou *et al.*, 2003; Pimentel-González *et al.*, 2009; Rodríguez-Huezo *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015), demostrando una menor estabilidad que el aceite de okara. Por esta razón, se requieren otro tipo de estrategias, tales como dobles

emulsiones y/o el agregado de fases acuosas adicionales para recubrir de manera más eficiente las cápsulas, y manteniéndolas más estables. El aceite de canola contiene un 57% de ácidos grasos monoinsaturados y un 21% de ácidos grasos poliinsaturados (Matthaus *et al.*, 2016). Por su parte, el aceite de sésamo está compuesto por un 39% de ácidos grasos monoinsaturados, 46% de poliinsaturados y el 13% de los ácidos grasos saturados (Nzikou *et al.*, 2009), y la grasa de la leche está compuesta principalmente por ácidos grasos de cadena corta, y una menor proporción de mono y poliinsaturados (Månsson, 2008). Tal como se mostró en la **Tabla II.1**, el aceite de okara, tiene una elevada contribución de ácidos grasos poliinsaturados, en particular, C18:2. Además, el contenido total de ácidos grasos poliinsaturados (18:2 + 18:3) fue de 62.58%, y el de C18:1, 21.34% (**Tabla II.1**). La estabilidad de las emulsiones formuladas con el aceite de okara podría explicarse teniendo en cuenta las elevadas proporciones de ácidos grasos poliinsaturados (**Figura II.10**). Como las gotas en una emulsión de O/W suelen ser líquidas porque las fases de aceite y agua deben estar en un estado líquido cuando se preparan las emulsiones (temperatura ~20°C), los ácidos grasos poliinsaturados (con temperaturas de fusión más bajas) son *a priori* más adecuados para formar emulsiones más estables, evitando procesos de cristalización (Bai y McClements, 2016).

Otra razón para explicar la mayor estabilidad de las muestras secadas en *spray* es por la morfología de las cápsulas. Como se pudo observar en las imágenes de SEM (**Figura II.7**), las cápsulas de las emulsiones secadas en *spray* fueron más uniformes y esféricas, sin porosidades aparentes, lo cual contribuiría a dificultar el ingreso del oxígeno. Se ha informado que la porosidad de la pared afecta la permeabilidad de las cápsulas al oxígeno y determina la estabilidad oxidativa de su contenido (Moreau y Rosemberg, 1999). Gallardo *et al.* 2013 prepararon emulsiones con aceite de linaza, y usaron diferentes proporciones de goma arábiga con el agregado o no de maltodextrina y proteína de suero. Los tiempos de inducción de las muestras constituidas sólo por goma arábiga y con el agregado de maltodextrina y proteína de suero aumentaron considerablemente en comparación con el presentado por el aceite de linaza. Esta mayor estabilidad estuvo relacionada con la morfología de las paredes de las cápsulas que no presentaron una porosidad aparente.

A pesar de estas ventajas, la presencia de altas proporciones de ácidos grasos poliinsaturados podría hacer que las emulsiones fueran más susceptibles a la oxidación.

Sin embargo, los tiempos de inducción y los valores de peróxido de las emulsiones deshidratadas (principalmente, las emulsiones O/W secadas en *spray*) fueron mucho más altos y más bajos, respectivamente (**Figura II.10**), que los de otros aceites comestibles (Bae y Lee, 2008; Binsi *et al.*, 2017; Ixtaina *et al.*, 2015; Pereyra Boué *et al.*, 2009). Este comportamiento puede explicarse teniendo en cuenta las propiedades antioxidantes del aceite de okara, atribuidas principalmente a la presencia de compuestos polifenólicos (genisteína, daidzeína) (Quitain *et al.*, 2006). Otros autores informaron resultados similares. Así, Gallardo *et al.* (2013) observaron que el agregado de proteínas de suero aumenta la estabilidad oxidativa de las cápsulas, atribuyendo dicha estabilidad a las propiedades antioxidantes de las proteínas de suero (Kuhn y Cunha, 2012).

Los elevados valores de tiempos de inducción obtenidos en emulsiones de 1:4 O/W secadas en *spray* pueden explicarse de dos maneras: A, comparando los procesos de deshidratación (liofilización y secado en *spray*), y B, comparando las diferentes relaciones usadas en la formulación de las emulsiones O/W.

Si se considera que las cápsulas de las muestras liofilizadas fueron más grandes y menos homogéneas que las secadas en *spray* (**Tabla II.3 y Figura II.8**), la superficie de contacto es mayor, por lo que son más susceptibles a la oxidación. En este sentido, Miyagawa y Adachi (2017) informaron que una reducción del tamaño de las gotas de aceite inhibe o retrasa la autooxidación. Los lípidos o aceites microencapsulados presentan características distintivas en el proceso de oxidación. Además, una reducción en el tamaño de las gotas de aceite también es eficaz para inhibir o retardar la oxidación de aceites microencapsulados.

Con respecto a las diferentes proporciones usadas para preparar las emulsiones O/W, las muestras 1:4 O/W secadas en *spray* (tanto las que tenían bacterias como los controles) tuvieron tiempos de inducción mucho más elevados. Esto puede explicarse considerando que la presencia de mayores concentraciones de proteínas estabiliza mejor las emulsiones O/W. Un comportamiento similar fue observado por distintos autores para emulsiones de similares características (Bai y McClements, 2016; Yadav *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2013; Taneja y Singh, 2015; Miyagawa y Adachi, 2017). Yadav *et al.* (2007) prepararon emulsiones O/W con goma arábica para encapsular aceites esenciales de cítricos. Los autores informaron que a mayores concentraciones de goma

arábiga se obtienen emulsiones más estables. Por otro lado, Taneja y Singh (2015) prepararon emulsiones O/W con aceite de soja y maltrodextrina, estabilizadas con diferentes concentraciones de caseinato de sodio (0.5 – 5% p/p) y posteriormente deshidratadas por secado en *spray*. Los autores informaron que las emulsiones mostraban mayor estabilidad para concentraciones cercanas al 5% de caseinato.

II.3.1.5. Estabilidad de los microorganismos encapsulados

En la **Figura II.11** se presentan los resultados de la viabilidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 contenido en las emulsiones liofilizadas y secadas en *spray*. No se observó una disminución significativa de viabilidad bacteriana para las emulsiones secadas en *spray* independientemente de la proporción O/W usada. Por el contrario, el proceso de liofilización llevó a una pérdida significativa de la viabilidad ($p < 0.05$). Además, esta disminución fue dependiente de las proporciones de O/W usadas, siendo la proporción 1:2 O/W la condición más drástica, ya que la viabilidad disminuyó de 13.91 ± 0.73 log UFC/g a 9.40 ± 0.31 log UFC/g. La proporción 1:4 O/W fue la mejor condición, observándose una disminución de 1.53 ± 0.08 log UFC/g (**Figura II.11**). Esto indica que en el caso de la liofilización, a mayor contenido de aceite en la emulsión, menor viabilidad bacteriana. Ying *et al.* (2012), prepararon emulsiones para encapsular *Lactobacillus rhamnosus* en donde utilizaron el aceite de girasol y una combinación de aislado de suero y almidón de maíz, que luego liofilizaron o secaron en *spray*. Al igual que en este capítulo de tesis, los autores no observaron una disminución significativa de la viabilidad bacteriana para el secado en *spray* (0.97 ± 0.30 log UFC/g) y en el caso de las emulsiones liofilizadas presentaron valores similares a las proporción 1:4 O/W (disminución de sólo 1.7 ± 0.30 log UFC/g).

Si bien la viabilidad para las muestras liofilizadas en este capítulo fue superior a la requerida para los productos probióticos (Aquilina *et al.*, 2013; Hill *et al.*, 2014; Tripathi y Giri, 2014), las propiedades físicas de las cápsulas liofilizadas (especialmente los Δ y los tamaños de partícula) hacen que no sean apropiadas para encapsular microorganismos. Por el contrario, las propiedades físicas de las emulsiones secadas en *spray* fueron diferentes, obteniéndose polvos menos pegajosos, más homogéneos (valores más bajos de Δ) y con tamaños de partícula más bajos, tiempos de inducción más altos y menores valores de peróxido (**Figuras II.8, II.10; Tablas II.2, II.3**). Gracias a

estas propiedades, no se observó una pérdida significativa de la viabilidad bacteriana ni durante el proceso de deshidratación ni durante el almacenamiento (**Figuras II.11, II.12**). Todas estas características permiten concluir que este sistema es el más apropiado para encapsular *L. plantarum* CIDCA 83114.

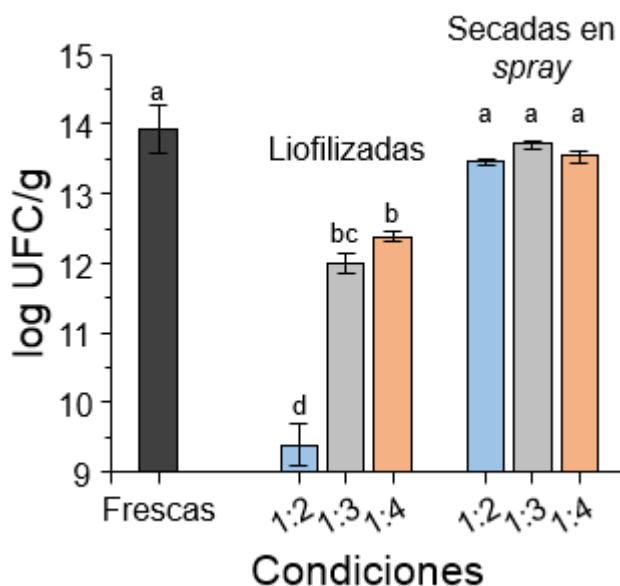


Figura II.11. Log UFC/g de cultivos frescos, de emulsiones en sus diferentes proporciones O/W (1:2; 1:3; 1:4) después de la liofilización y del secado en *spray*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Los recuentos en placa para muestras liofilizadas y secadas en *spray* sin emulsionar fueron 8.09 ± 0.54 log UFC/mL y 8.52 ± 0.46 log UFC/mL, respectivamente.

Las emulsiones también presentaron un comportamiento diferente de acuerdo al proceso de deshidratación usado (liofilización o secado en *spray*) (**Figura II.12**). En el caso de las muestras liofilizadas, las relaciones 1:3 y 1:4 O/W mostraron un comportamiento similar, sin pérdida significativa de la viabilidad hasta el día 45 del almacenamiento (**Figura II.12 A**). La viabilidad comenzó a disminuir a partir del día 60, y después de los 90 días de almacenamiento, la pérdida de viabilidad fue de aproximadamente 4 log para ambas emulsiones O/W. No sucedió lo mismo con la emulsión 1:2 O/W, que a los 15 días de almacenamiento ya experimentó una disminución de la viabilidad, la cual aumentó hasta 5.00 ± 0.09 UFC/g luego de los 90 días de almacenamiento (**Figura II.12 A**).

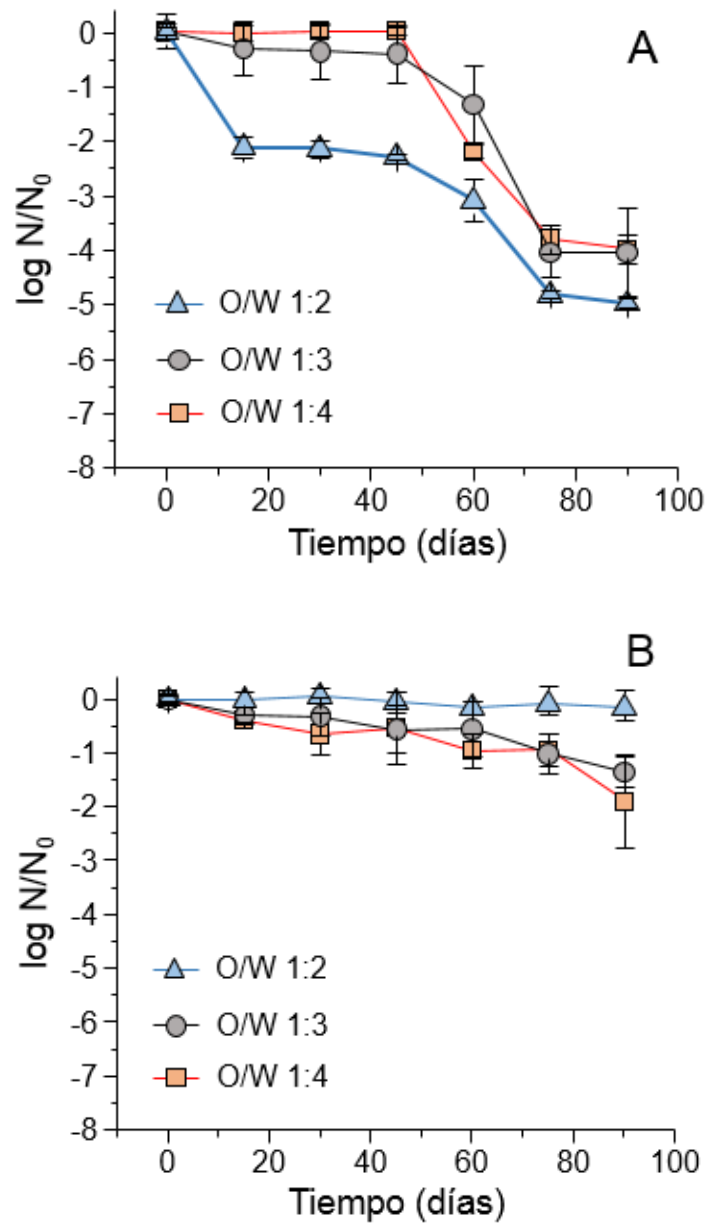


Figura II.12. Log N/N_0 de *L. plantarum* CIDCA 83114 durante el almacenamiento a 4°C. N_0 : log UFC/g inmediatamente después de: **A.** liofilización; **B.** secado en *spray* (tiempo 0). Los valores de N_0 corresponden a la UFC/g que se muestra en la Figura 5; N : log UFC/g en cada momento del almacenamiento.

Por el contrario, las emulsiones secadas en *spray* fueron sistemas de encapsulación mucho mejores también durante el almacenamiento, ya que no se observó una disminución significativa de la viabilidad hasta el día 60 en ninguna de las condiciones analizadas (**Figura II.12 B**). Sólo después de 90 días de almacenamiento se observó una pequeña disminución que no fue mayor a 1.89 ± 0.87 log UFC/g en ninguno

de los casos. Estos datos fueron comparables con los obtenidos por Ying *et al.*, (2012). Si bien estos autores sólo utilizaron una proporción O/W para realizar las emulsiones, al igual que los datos presentados en este capítulo, durante el almacenamiento la viabilidad bacteriana se vio más afectada para las muestras liofilizadas (-4 log) que para las muestras secadas en *spray* (-2 log). Diferentes factores contribuyen a la estabilidad de las muestras de bacterias deshidratadas, tales como la cepa utilizada, el método de secado, el tamaño de partícula, la composición de la matriz y las condiciones de almacenamiento (Larena *et al.*, 2003; Picot y Lacroix 2003; Wang *et al.*, 2004; Ananta *et al.*, 2005; Chávez y Ledebøer 2007). Teniendo en cuenta que el secado en *spray* es un proceso económico, fácilmente escalable y con bajo consumo energético, y que además, las emulsiones de *L. plantarum* CIDCA 83114 secadas en *spray* fueron las que presentaron mayor estabilidad físico-química y mayor viabilidad (**Figuras II.10, II.11**), los resultados obtenidos parecen interesantes para su aplicación a nivel industrial.

Los resultados obtenidos en este capítulo mostraron claramente que una mayor estabilidad físico-química conduce a una mayor estabilidad para los microorganismos encapsulados, demostrando así la importancia de definir formulaciones adecuadas para las emulsiones que apuntan a encapsular los microorganismos de manera eficiente.

Conclusiones

- Las emulsiones usando aceite de okara demostraron ser estables y lograron la incorporación de *L. plantarum* CIDCA 83114 en la matriz de encapsulado.
- El secado en *spray* resultó ser un método más adecuado para deshidratar las emulsiones formadas, dando lugar a menores tamaños de las emulsiones con respecto a los tamaños de los productos liofilizados.
- Las emulsiones secadas en *spray* mostraron una mayor estabilidad con tiempos de inducción mayores y valores de peróxidos menores a los obtenidos en el proceso de liofilización.
- El secado en *spray* resultó ser el proceso más adecuado para estabilizar *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 durante los procesos de deshidratación. El secado en *spray* no mostró una disminución significativa de la viabilidad bacteriana, independientemente de la proporción O/W usada.
- El secado en *spray* también resultó el proceso más adecuado para estabilizar las bacterias durante su almacenamiento a 90 días.

Técnicas innovadoras para la encapsulación bacteriana: A. Encapsulación capa por capa; B. Formulación de emulsiones por microfluidización

PARTE 2

PARTE A

II.2.2. Materiales y Métodos

II.2.2.1. Síntesis del copolímero

II.2.2.1.1. Ácido poliacrílico (PAA) - ácido plurónico (PLU) - ácido poliacrílico (PAA) (PAA-PLU-AA o PPP)

La síntesis del copolímero y su caracterización fue realizada por un grupo de trabajo del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Coimbra, Portugal, bajo el marco de un proyecto de colaboración entre Argentina-Portugal. El PPP se sintetizó mediante polimerización por emulsión (Alakhov *et al.*, 2004; Choo *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2008). Para ello se disolvió el ácido plurónico (PLU), (F127, de 12600 Da o F68 de 8400) (BASF Chemicals, NJ, EE. UU.), de diferentes pesos moleculares en ácido acrílico (AA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y se neutralizó con 0.5 mL de NaOH 5 M bajo agitación constante en corriente de nitrógeno. La adición de AA se hizo de manera proporcional, teniendo en cuenta el número de grupos terminales -OH presentes en cada PLU, con el objeto de obtener el mismo número de AA para cada copolímero. Luego se disolvieron 100 mg de lauril peróxido (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y 100 mg de 4-azobis-(ácido 4-cianoaléico) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) en 5 mL de AA, que fueron incorporados en la solución de PLU. La solución final fue colocada en un matraz de 500 mL y se adicionaron 250 mL de solución de Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) en nonano (1% v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) previamente desoxigenado durante 1 hora en corriente de nitrógeno. El reactor fue calentado a 70°C durante 10 horas. El polímero obtenido fue lavado con hexano (VWR Chemicals, MA, EE. UU.) y agua para eliminar impurezas, y secado en estufa de vacío a 40°C durante 48 horas. Como producto de reacción, se obtuvieron dos polímeros: uno denominado **PPP12**, con un peso molecular aproximado de 11671 kDa , y otro denominado **PPP24**, con un peso molecular de 24322 kDa. El esquema de la reacción se presenta en el Esquema II.1 (Capítulo II, Introducción, sección II.2.2.1.)

II.2.2.2. Caracterización del copolímero

II.2.2.2.1. Resonancia magnética nuclear (RMN). Se registraron los espectros ^1H -RMN en un espectrómetro Bruker Advance III 400 MHz 9.4 T (Karlsruhe, Alemania). Las muestras se disolvieron en tetrahidrofurano deuterado (d8-THF) (Euriscotop, Saint-Aubin, Francia) y se analizaron en tubos de 5 mm de diámetro, utilizando tetrametilsilano como estándar interno.

II.2.2.2.2. Espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR). Los espectros fueron registrados en un espectrómetro Thermo Nicolet iS10 (Thermo Scientific, NJ, EE. UU.) con accesorio de ATR (reflectancia total atenuada), en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} . Se realizaron 64 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} .

II.2.2.3. Cepas y condiciones de crecimiento

II.2.2.3.1. Microorganismos utilizados. Se utilizó la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333, aislada a partir de un fermento comercial (Gómez-Zavaglia *et al.*, 1999), y además, como en los capítulos anteriores, se utilizó *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114.

II.2.2.3.2. Condiciones de crecimiento. Se partió de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 proveniente del cepario del CIDCA, conservada a -80°C en 120 g/L de leche descremada (Difco, USA). Los microorganismos fueron reactivados en caldo MRS (de Man *et al.*, 1960) (inóculo al 1% v/v), durante 48 horas a 37°C . Luego se realizó un repique en caldo MRS, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las condiciones de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 fueron explicadas en Materiales y Métodos, Capítulo 1, sección I.2.6. Los cultivos en la fase estacionaria, 5×10^8 UFC/mL para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 (Tymcyszyn *et al.*, 2011) y 1×10^{11} UFC/mL para *L. plantarum* CIDCA 83114, fueron centrifugados a 6000 g durante 10 minutos (Hermle Centrifuge Z 326 K, Gosheim, Alemania), y lavados dos veces con *buffer* fosfato-salino (PBS). Los *pellets* bacterianos fueron conservados a 4°C hasta el momento de encapsular.

II.2.2.4. Encapsulación bacteriana *layer-by-layer* (LbL)

El quitosano (MW 100.000 a 300.000, Acros Organics, NJ, EE. UU.) se preparó al 1% (p/v) en *buffer* acetato - ácido acético. Se pesaron 3.5 g de acetato de sodio, se disolvieron en 1 litro de agua destilada y se adicionaron 3.5 mL de ácido acético glacial. Luego se incorporó quitosano y se agitó el tiempo necesario para su completa disolución en el *buffer* y se llevó a pH 6 con solución de NaOH 0.5 M. Se prepararon soluciones de los polímeros PPP12 al 1% (p/v) y PPP24 al 0.5% (p/v) en NaCl 0.5 M pH 6, agitando durante 24 horas y ajustando el pH en caso de ser necesario.

Los *pellets* bacterianos obtenidos en la sección II.2.2.3.2 fueron resuspendidos en 20 mL de quitosano (primera capa, carga positiva) teniendo en cuenta que la superficie bacteriana es negativa. Para lograr que esta primera capa se deposite sobre los microorganismos, se incubó 1 hora a 37°C con agitación constante de 200 g (MaxQ 4000, Thermo Scientific, NJ, EE. UU.). A este primer encapsulado se lo denominó [(CHI/PPP) 1/0], donde *CHI* representa el quitosano, *PPP*, el polímero, *1*, el número de capa de CHI y *0*, el número de capa de PPP.

Luego de la incubación, se centrifugó a 6000 g durante 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces con PBS para eliminar todo el excedente de quitosano. El mismo procedimiento se realizó para adicionar la segunda capa (PPP 12 o PPP24), es decir, se resuspendió a las bacterias recubiertas por una capa de quitosano en 20 mL de PPP12 o PPP24, y se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación constante a 200 g. De esta manera se obtuvieron los encapsulados (CHI/PPP) 1/1, es decir, bacterias recubiertas con una capa de CHI y una capa de PPP.

Este procedimiento se repitió dos veces más, alternando entre una capa y la otra (CHI y PPP), hasta obtener microorganismos recubiertos con tres capas [dos de CHI y una capa de PPP, [(CHI/PPP) 2/1]], y con cuatro capas [dos de CHI y dos de PPP [(CHI/PPP) 2/2]].

Para asegurar un correcto autoensamblaje de las capas sobre las bacterias, se ajustó el pH de todas las soluciones a un valor de 6. A este pH, los grupos amino del quitosano se encuentran protonados (pKa = 6.5), es decir, tienen carga positiva, y los grupos carboxilo del PLU se encuentran desprotonados (pKa = 4.95), es decir, con carga negativa, logrando así que las capas se depositen de manera correcta.

II.2.2.5. Evaluación de los encapsulados

II.2.2.5.1. Potencial zeta (ζ). Para corroborar que la encapsulación fue correcta y que las capas se depositaron una sobre otra, se determinó el potencial ζ luego de adicionar cada capa individual (Malvern Instrument Zetasizer Nano-Z). Para ello, los encapsulados fueron diluidos en agua destilada, y se determinó el potencial ζ tal como se indicó en la Parte 1, sección II.2.1.5.3. Para cada muestra se tomaron al menos 20 valores de potencial ζ .

II.2.2.5.2. Cinética de crecimiento por determinación de la absorbancia. Luego del agregado de cada una de las capas (CHI y PPP, respectivamente), las bacterias encapsuladas se inocularon en caldo MRS (1% v/v) y se incubaron a 37°C y se determinó la absorbancia a 600 nm a intervalos regulares. Como controles se utilizaron bacterias sin encapsular.

II.2.2.6. Microscopía confocal

El tamaño, la integridad y la permeabilidad de las bacterias encapsuladas y no encapsuladas fueron determinados utilizando un microscopio confocal (Leica TCS SP5 Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Para ello se utilizaron dos marcadores: isotiocianato de fluoresceína unido a inulina (FITC-Inulina) (F3272, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como marcador de microorganismos vivos, y yoduro de To-Pro[®]-3 (Thermofisher Scientific, Nueva Jersey, USA), como marcador bacterias dañadas, tal como se explicó en Materiales y Métodos del capítulo 2, Parte 1, sección II.2.1.4.2.

Las bacterias encapsuladas y no encapsuladas (controles) fueron resuspendidas en agua destilada ($\sim 10^8$ células/mL). En una primera fase, se adicionó FITC-inulina (concentración final: 0.8 mM) y se incubó a 37°C durante 1 hora. Luego se agregó metanol al 25% v/v para fijar los microorganismos y se incubó 5 minutos a 20°C. Finalmente, las células se marcaron con yoduro de To-Pro[®]-3 (concentración final: 1 mM) y se incubaron a 37°C durante 5 minutos.

Para la observación microscópica se tomó una alícuota de los preparados y se la colocó sobre portaobjetos de vidrio bajo flujo de aire estéril. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 488 nm y 633 nm para FITC-inulina y yoduro de To-Pro[®]-3, respectivamente.

II.2.2.7. Proceso de deshidratación y almacenamiento

II.2.2.7.1. Liofilización

Los microorganismos encapsulados con diferentes números de capas fueron resuspendidos en PBS y centrifugados a 6000 *g* durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y los *pellets* fueron resuspendidos en una solución de sacarosa (Biopack, Buenos Aires, Argentina) 20% p/v, congelados a -80°C y liofilizados, tal como se indicó en el Capítulo 1, Materiales y Métodos, sección I.2.9.1. Como controles se utilizaron bacterias no encapsuladas (cultivos frescos), resuspendidas en la misma solución de sacarosa que se utilizó para las encapsuladas.

II.2.2.7.2. Almacenamiento

Los microorganismos liofilizados (encapsulados y no encapsulados) fueron resuspendidos en PBS, agitados en *vortex*. Luego se hicieron diluciones seriadas en PBS, se plaquearon en agar MRS y se incubaron a 37°C durante 48 horas en aerobiosis. Los resultados fueron expresados como log UFC/mL. Los microorganismos liofilizados fueron almacenados a 4°C durante 60 días en desecadores con silica gel, realizando recuentos a intervalos regulares.

II.2.2.8. Exposición a condiciones gastro-intestinales simuladas

El ensayo se dividió en dos etapas: la etapa gástrica y la etapa intestinal. La composición de los fluidos gástricos e intestinales (duodenal y bilis) son los mismos a los indicados en la Tabla I.3, Materiales y métodos del Capítulo 1, sección I.2.14.

Los microorganismos encapsulados con diferentes números de capas ([[(CHI/PPP) 1/0; 1/1; 2/1; 2/2]]) fueron resuspendidos en PBS y agitados en *vortex*, y se dejaron reposar a 20°C durante 30 minutos (controles: microorganismos no encapsulados). Luego, las muestras fueron centrifugadas a 6000 *g* durante 5 minutos, los sobrenadantes descartados y los microorganismos encapsulados, resuspendidos en solución gástrica. Se incubó a 37°C durante 90 minutos, en oscuridad, con agitación constante de 100 *g* (MaxQ 4000, Thermo Scientific, USA), se centrifugó a 6000 *g* durante 5 minutos para detener la reacción, se lavó una vez con PBS y se realizaron recuentos en agar MRS (etapa gástrica). En paralelo, se continuó con la digestión intestinal, resuspendiendo los microorganismos ya expuestos a la fase gástrica, a la solución intestinal simulada. Se incubó a 37°C durante 90 minutos, en oscuridad con agitación constante de 100 *g*. Una

vez finalizada la exposición al fluido intestinal simulado, los microorganismos encapsulados fueron centrifugados a 6000 *g* durante 5 minutos, y lavados una vez con PBS. Luego se hicieron recuentos en placa para todos los encapsulados. Los resultados se expresaron en log UFC/mL.

II.2.2.9. Actividad deshidrogenasa mitocondrial (MTT)

Se investigó la eventual toxicidad de los polímeros utilizados a través de la determinación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial, mediante el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ol)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para ello se utilizaron células Caco-2/TC7 en postconfluencia, las cuales fueron sembradas en duplicado en placas de 24 *wells* (~ 1x10⁵ células/well), y se incubó durante 5 días a 37°C. Luego se adicionaron los microorganismos encapsulados (concentración de 1x10⁸ UFC/mL) y se incubó durante 24 h a 37°C. Luego, las células fueron lavadas dos veces con PBS (pH 7.0) y se reemplazó el medio por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (sin colorante rojo fenol), con 0.5 mg/mL de MTT. Luego de 3 horas de incubación a 37°C, se adicionaron 0.2 mL de dimetilsulfóxido para eliminar el formazán de las células y se registró la absorbancia a 560 nm en un lector de microplacas (Synergy HT, Bio-Tek Instruments, Vermont, USA). La viabilidad celular se determinó de acuerdo a la ecuación (1):

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = (\text{DO}_t) / (\text{DO}_c) \times 100\% \quad \text{Ecuación 1}$$

donde DO_t es la densidad óptica de las células tratadas con microorganismos (encapsulados o no) y DO_c es la densidad óptica control (células no tratadas).

Parte B

II.2.2.10. Preparación de los dispositivos microfluídicos

La técnica de encapsulación por microfluídica se utilizó en el Laboratorio de Bioquímica, de la Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo, España. Para preparar dispositivos microfluidicos, denominados *chips*, se pesó en un vaso plástico 15

g de elastómero (SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Base, Midland, MI, USA) y 1.5 g de agente curante (SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Curing Agent, Midland, MI, USA) manteniendo siempre una relación 10:1. Como el elastómero presenta una alta viscosidad, fue adicionado de manera gradual con cuchara plástica o pipeta hasta alcanzar el peso adecuado. Por su parte, el agente curante fue incorporado gota a gota con pipeta Pasteur hasta completar el peso. Luego, se homogenizó la mezcla durante 5 minutos con un tenedor de plástico, hasta lograr la integración total de ambos. Luego, se colocó el vaso en un desecador conectado a una bomba de vacío y se degasificó hasta la desaparición total de burbujas. Una vez degasificado, se distribuyó la preparación sobre una caja de Petri, que contenía un molde con la impresión de los *chips* de trabajo (50, 100 y 200 μm) unido a la superficie (**Figura II.13 A**). Este molde fue fabricado previamente por técnicas litográficas, es decir, depositando una capa de resina fotosintética sobre un sustrato y haciendo pasar un haz de luz ultravioleta (UV) a través de una cámara con el diseño del dispositivo microfluídico impreso en el molde. Luego de distribuir de manera uniforme el contenido en el molde, se colocó nuevamente en desecador para una segunda degasificación. Finalmente, se tapó el molde y se lo colocó en estufa a 65°C durante toda la noche para el proceso de curado (aproximadamente de 12 a 15 horas).

Al día siguiente, se retiró la caja de Petri de la estufa y se la dejó enfriar a 20°C. Luego, con un bisturí se cortó cuidadosamente alrededor del cuadrante donde se encontraba la impresión de los *chips* (**Figura II.13 B**) para evitar romper los *chips* fabricados y para evitar romper el molde, que servirá para la fabricación de futuros *chips*. Una vez cortado, los *chips* fueron despegados cuidadosamente del molde (**Figura II.13 C**). Con la ayuda de un sacabocados retráctil de 1 mm de diámetro, se perforaron los puntos de entrada, y de salida (**Figura II.13 D**). Luego, se cubrió el preparado con una cinta adhesiva para evitar que los canales se ensuciaran. El último paso fue unir los *chips* a placas de vidrio (portaobjetos) para que de esta manera quedaran sellados y listos para ser utilizados. El sellado se logró con un tratamiento con plasma de O₂ en sala blanca, tal como se detalla a continuación:

- i. Se encendió la bomba de vacío y la máquina de plasma;
- ii. Se fijaron las condiciones de potencia (100 watts) y de flujo de gas (150 ml/min);

- iii. Se colocaron los *chips* y los vidrios en la cámara de sellado, dejando expuesta la cara por donde se unirán;
- iv. Se cerró la cámara y se hizo vacío hasta estabilizar (aproximadamente 0.3 -0.5 bar);
- v. Se abrió el tubo de oxígeno;
- vi. Una vez estabilizado el flujo de oxígeno, se activó el plasma y se dejó descansar durante 2 minutos;
- vii. Luego se desconectó el plasma, se cerró el gas y se rompió el vacío.
- viii. Se abrió la cámara, se retiraron los *chips*, los vidrios y se los unió rápidamente, presionando levemente y verificando que no quedaran burbujas;
- ix. Se calentaron 5 – 10 minutos en placa calefactora a 100°C para reforzar la unión;
- x. Finalmente, se cerró el tubo de oxígeno, y la válvula de entrada de gas. Se dejó la cámara cerrada y se desconectaron la bomba y el generador de plasma.

Una vez sellados al vidrio (**Figura II.13 E**), se colocó una cinta adhesiva sobre los *chips* para protegerlos del polvo (**Figura II.13 F**).

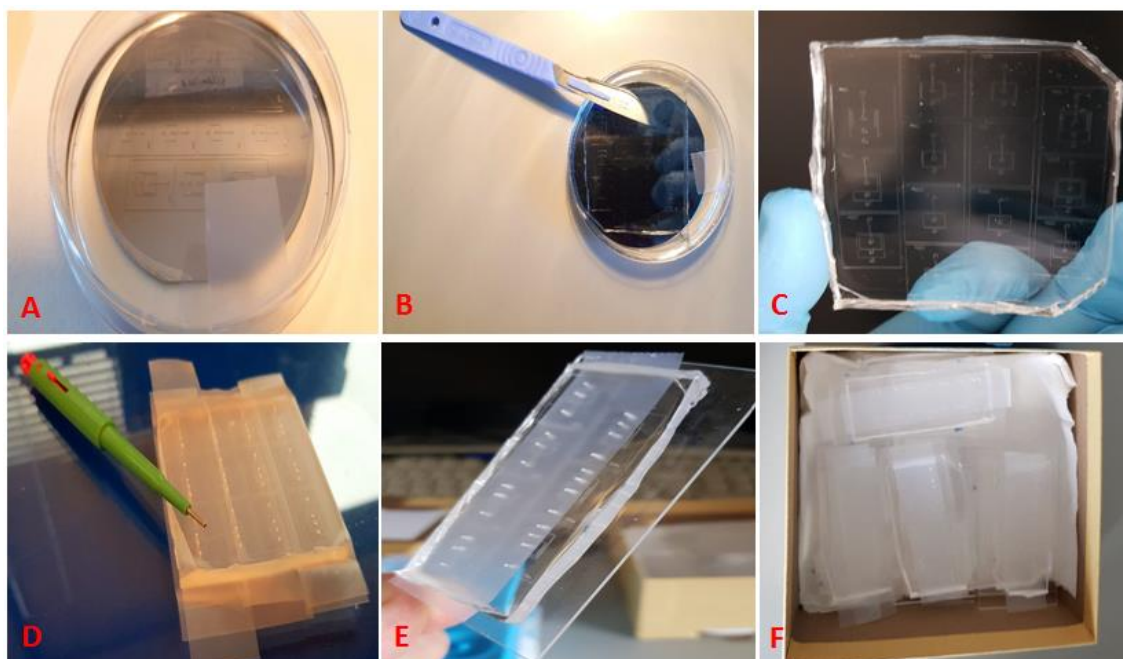


Figura II.13. Pasos para la fabricación de los *chips*. **A.** Molde sobre caja de petri con la impresión de los *chips* de trabajo. **B.** Placa con los *chips* preparados lista para cortar. **C.** Placa con los *chips* impresos. **D.** Sacabocados para realizar los agujeros en los puntos de entrada y salida de los *chips*. **E.** Placa con *chips* sellados sobre placa de vidrio (portaobjeto) y listos para ser usados. **F.** *Chips* con cinta adhesiva y guardados para evitar la entra de polvo en los canales microfluídicos.

II.2.2.11. Formulación de emulsiones

II.2.2.11.1. Armado del equipo

Para la formulación de las emulsiones, se usaron *chips* con dos entradas y una salida, y *chips* de tres entradas y una salida, cuyos canales tenían un diámetro de 200 μm (Figura II.14).

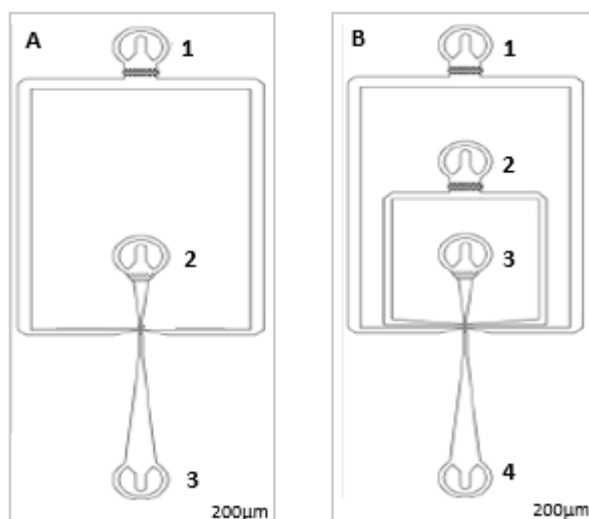


Figura II.14. Figura esquemática de los *chips* de trabajo. **A.** *Chip* con dos puntos de entrada, en donde 1. Punto de entrada de la fase oleosa; 2. Punto de entrada de la fase acuosa; y 3. Punto de salida. **B.** *Chip* con tres puntos de entrada, en donde 1. Entrada de la fase oleosa; 2. Entrada de la fase acuosa 2; 3. Entrada de la fase acuosa 1; y 4. Punto de salida

Las soluciones utilizadas para formar las emulsiones se cargaron en jeringas de vidrio de 1 mL para la fase oleosa y 100 μL para las fases acuosas. En una primera instancia, se encendió la computadora conectada al equipo de microfluídica. Además, se encendió la plataforma de microfluídica y se abrió el *software* Nemesys (Nemesys Interface, Madrid, España), que permite controlar las condiciones de flujo de las bombas, donde se colocan las jeringas que son inyectadas en los dispositivos microfluídicos, (Figura II.15 A y B). Luego se posicionaron las bombas en el nivel inicial y se colocaron las jeringas en las respectivas bombas, asegurando que quedaran niveladas y fijas, tanto el cuerpo como el émbolo (Figura II.15 C y D). Luego se abrió el *software* Vimba (Vimba v3.1 ARM64, Germany) de la cámara fotográfica conectada al microscopio, con la que fue posible observar los *chips* y la formación de emulsiones (Figura II.15 E). Para evitar filtraciones, antes de comenzar se observó el *chip* utilizado en el microscopio para comprobar que todos sus canales estuvieran libres y correctamente sellados. Para conectar las jeringas con los *chips* y lograr el flujo de las

soluciones, se utilizaron tubos de polietileno de calibre fino (Portex, Smiths medical, Keene, USA) con un diámetro interno de 0.38 mm. Se cortó la medida necesaria del tubo, y con la ayuda de una pinza se conectó un extremo del tubo a la salida de las jeringas (Figura II.15 F). Las bombas fueron activadas a través del *software* (antes de conectar los tubos al *chip*), para que circularan las soluciones y evitar la entrada de aire a los canales. Los *chips* fueron fijados con cinta adhesiva a la placa de microscopio. Luego, con las pinzas se conectaron los otros extremos del tubo a los puntos de entrada de los *chips*. (Figura II.15 G). Se conectó otro tubo al punto de salida para recolectar las emulsiones formadas en tubos *ependorfs* (Figura II.15 H). Finalmente, se ajustaron los parámetros de flujo y se inició el programa. El equipo completo se puede observar en la Figura II.15 I.



Figura II.15. Secuencia completa del armado del equipo de microfluídica. **A.** *Software* Nemesys que permite controlar las bombas del equipo. **B.** Equipo donde se colocan las jeringas con las fases para ser inyectadas por medio de las bombas. **C y D.** Jeringas con las fases colocadas en las bombas, aseguradas y fijas, tanto cuerpo como émbolo. **E.** Microscopio con cámara fotográfica que permite observar las emulsiones en tiempo real. **F.** Tubos que conectan los extremos de las jeringas con los chips. **G.** *Chip* fijado sobre platina del microscopio. **H.** *Chip* con las conexiones de los tubos a los puntos de entrada y al punto de salida conectado a un tubo *ependorfs* de recolección de muestra. **I.** Equipo de microfluídica completo.

II.2.2.11.2. Preparación de emulsiones agua/aceite (W/O)

Se formularon emulsiones agua en aceite (W/O) utilizando *chips* de 2 y 3 entradas, con un tamaño de los canales de 200 μm . Como fase oleosa se utilizó aceite de okara y lecitina 4% p/v (Scharlab, Barcelona, España) como emulsionante. Como fase acuosa se utilizaron:

- el polímero PPP12 utilizado en la Parte A, preparado al 2% (p/v) en NaCl 0.5 M,
- y alginato de sodio (Alfa Aesar, Tewksbury, USA) preparado al 1.5% (p/v) en agua destilada.

Tabla II.4. Condiciones utilizadas para la formación de las emulsiones. Ensayos I y III *chips* de 2 entradas; Ensayos II y IV *chips* de 3 entradas.

Emulsiones			
Ensayo	Fases	Composición	Flujos $\mu\text{L}/\text{h}$
Control	Dispersa	Agua + <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 + 6-carboxy-fluoresceína 0.5 μM	120
	Continua	Aceite okara + lecitina 4% p/v	960
I	Dispersa	PPP12 2% p/v + <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 + 6-carboxy-fluoresceína 0.5 μM	120
	Continua	Aceite okara + lecitina 4% p/v	600
II	Dispersa 1	PPP12 2% + <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 + 6-carboxy-fluoresceína 0.5 μM	40
	Dispersa 2	Alginato de sodio 1.5% p/v	60
	Continua	Aceite okara + lecitina 4% p/v	600
III	Dispersa	Alginato de sodio 1.5% p/v + <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 + 6-carboxy-fluoresceína 0.5 μM	60
	Continua	Aceite okara + lecitina 4% p/v	600
IV	Dispersa 1	Alginato de sodio 1.5% p/v + <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 + 6-carboxy-fluoresceína 0.5 μM	40
	Dispersa 2	PPP12 2% p/v	60
	Continua	Aceite okara + lecitina 4% p/v	600

Como material a encapsular se utilizó *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. Los cultivos en la fase estacionaria 1×10^{11} UFC/mL (Materiales y Métodos, Capítulo 1, sección I.2.6.), fueron centrifugados a 6000 g durante 10 minutos (Hermle Centrifuge Z 326 K, Gosheim, Alemania), y lavados dos veces con *buffer* fosfato-salino (PBS). Los *pellets* bacterianos se resuspendieron en la fase dispersa. Asimismo, se adicionó 6-

carboxy-fluoresceína (Fluka, BioChemika, España) 0.5 μM como marcador de las emulsiones. Las condiciones de encapsulación se detallan en la **Tabla II.4**.

II.2.2.12. Liofilización y conservación

Las muestras fueron recogidas en tubos *ependorf*, que posteriormente fueron congelados a -80°C durante 48 horas y liofilizados a -85°C usando un liofilizador Lyoquest -85 (Telstar Technologies, S.L., España) durante 48 horas. Las muestras liofilizadas fueron almacenadas a 4°C en desecadores que contenían silicagel.

Antes y después de los procesos de liofilización se realizaron recuentos en placa para cada una de las emulsiones obtenidas en todos los ensayos y en el control, tal como se explicó en el capítulo 1. Los resultados se expresaron como log UFC/mL.

II.2.2.13. Microscopía de fluorescencia

Para observar las emulsiones marcadas se utilizó un microscopio de fluorescencia Nikon Model Eclipse TS100LED-F MV (Germany). Para ello, se conectó la fuente de energía LED y se programó una intensidad inicial del 5% mV, que luego fue incrementada en caso de ser necesario. A continuación, se abrió el *software* Vimba viewer para poder observar las imágenes directamente en el ordenador o a través de los binoculares. Para observar las emulsiones se utilizaron placas FAST READ 102^R, compuestas por 10 pocillos (Figura II.16). Se tomó 0.1 μL de emulsión y se mezcló con 9 μL del aceite con el que se trabajó (aceite de okara) (dilución 1:10). Se homogenizó con la misma pipeta y se tomaron 8 μL para colocar en uno de los pocillos de la placa.

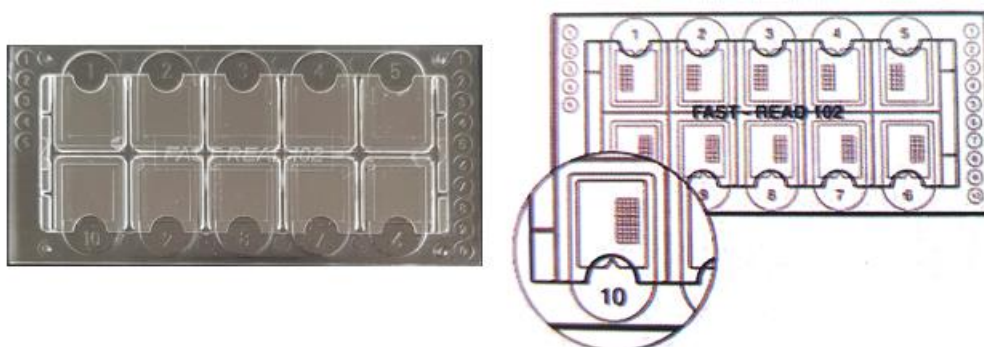


Figura II.16. Placa Fast Read 102 compuesta por 10 pocillos para observar las emulsiones.

Luego se colocó la placa sobre la platina del microscopio, y se enfocó con los objetivos hasta visualizar los cuadrantes con las emulsiones. Para observar la

fluorescencia, se apagaron las luces de la sala y del microscopio, se colocó el filtro de fluorescencia y se posicionó el diafragma en el medio. Para cerrar la entrada de luz LED, fue necesario quitar el filtro cuando no se usaba fluorescencia.

Por medio de *software* Fiji (Madison, Java8, Germany) pudieron ser calculados los tamaños de gota de las emulsiones frescas y liofilizadas (**Figura II.17**).

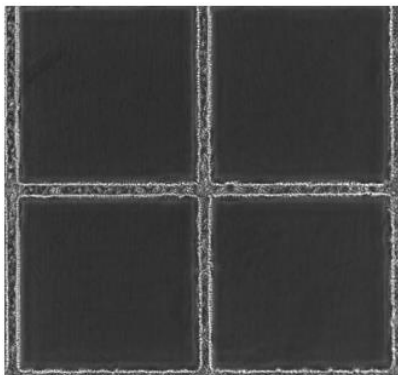


Figura II.17. Cuadrilla de placa Fast Read. Permite medir las emulsiones que entran dentro del cuadrante

II.2.2.14. Digestión gastro-intestinal simulada

Sobre las muestras liofilizadas correspondientes a cada una de los ensayos descritos en la **Tabla II.4** (I, II, III y IV), se realizó una digestión *in vitro*, utilizando el protocolo de la Materiales y Métodos del Capítulo 1, sección I.2.14. Se utilizaron emulsiones liofilizadas sin polímero PPP12 ni alginato como controles.

Luego de cada fase de la digestión, se realizaron diluciones seriadas de las emulsiones en PBS y se plaquearon en agar MRS para determinar la viabilidad bacteriana. Los resultados se expresaron en log UFC/mL.

II.2.2.15. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado utilizando cultivos independientes. Para el análisis de datos se usaron los valores promedio. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para todos los ensayos, utilizando el programa estadístico InfoStat 2008 (Grupo Infostat/FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Ed. Brujas, Córdoba, Argentina). La comparación de medias se realizó utilizando el método de Tukey, y si $p < 0.05$, la diferencia se consideró estadísticamente significativa.

Parte A

II.3.2. Resultados y Discusión

En esta parte del capítulo, se utilizaron dos polímeros de diferente peso molecular (PPP12 y PPP24) para la encapsulación LbL de dos cepas: (A) *L. plantarum* CIDCA 83114; y (B) *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333. Uno de los objetivos de este capítulo fue investigar el efecto protector que ejercen los polímeros como agentes encapsulantes de microorganismos. Teniendo en cuenta la elevada resistencia de la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114 frente a diferentes procesos de preservación (liofilización, secado en *spray*), tal como se observó en el capítulos 1 y 2 (Parte 1), en esta parte del capítulo se decidió incorporar una cepa altamente sensible a todos los procesos de preservación y al ambiente gastrointestinal, el *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 (Romano *et al.*, 2016; Tymczyszyn *et al.*, 2008, 2011, 2012). Esto permitió evaluar el efecto protector de los polímeros utilizados

II.3.2.1. Síntesis y caracterización de los copolímeros

Para evaluar la influencia del peso molecular sobre la encapsulación bacteriana, se utilizaron dos PLU de peso molecular diferente. Teniendo en cuenta la diferencia en los pesos moleculares de los PLU, se sintetizaron dos copolímeros con igual número de unidades de AA. Esto dio lugar a dos PPP sintetizados con diferentes pesos moleculares.

La estructura química de los dos copolímeros obtenidos, y la de los reactivos utilizados (PLU y AA) fueron determinadas mediante FTIR y ¹H-RMN. Los espectros de PLU F68 y F127 fueron muy similares entre sí, y por esta razón, sólo se muestra uno de ellos en la **Figura II.18**. En la **Figura II.18 A (1)** se presenta el espectro ¹H-RMN del PLU, donde el pico que se observa en la posición 1.1 ppm (a) corresponde al hidrógeno metílico del segmento (-CH-CH₃), y el de la posición 1.6 ppm, al grupo -OH terminal.

Por su parte, en los espectros correspondientes al AA se observa un claro desplazamiento, característico del grupo vinílico (HC=CH₂), ubicado en la posición 5.5–6.5 ppm (picos **c, d y e, Figura II.18 A (2)**). Estos últimos picos desaparecieron completamente en los espectros de PPP (**Figura II.18 A (3 y 4)**), indicando una correcta purificación de los copolímeros obtenidos, ya que no se observó la presencia residual del monómero AA. Además, en los espectros obtenidos (posiciones 2.2-2.8 ppm) se

observó el hidrógeno del grupo metino (-CH-CH₂) de las unidades AA (pico **g** en la figura) y el hidrógeno metílico del segmento PLU (-CH-CH₃) en 1.1 ppm (pico **a** en la **Figura II.18 A (3) y (4)**). Todas estas características indican la correcta síntesis de PPP.

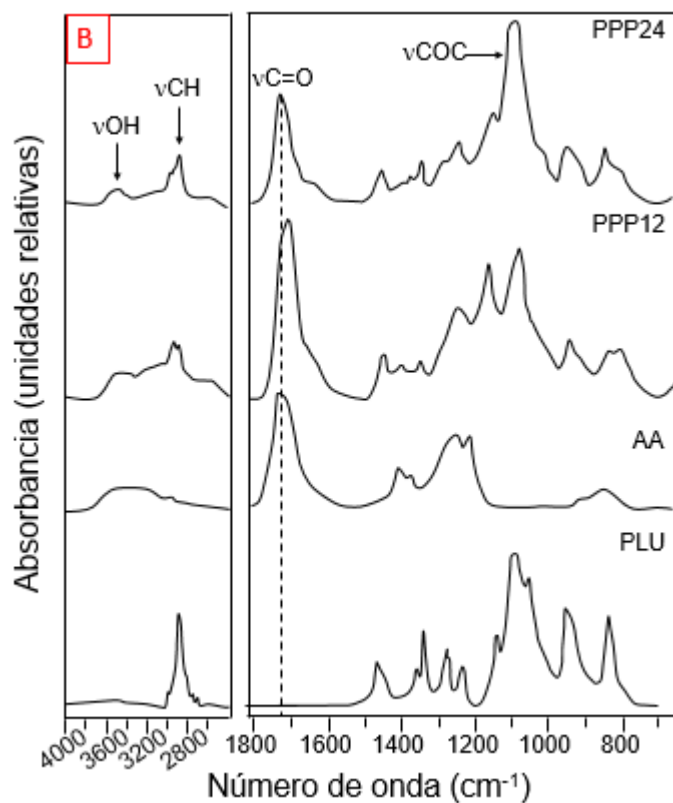
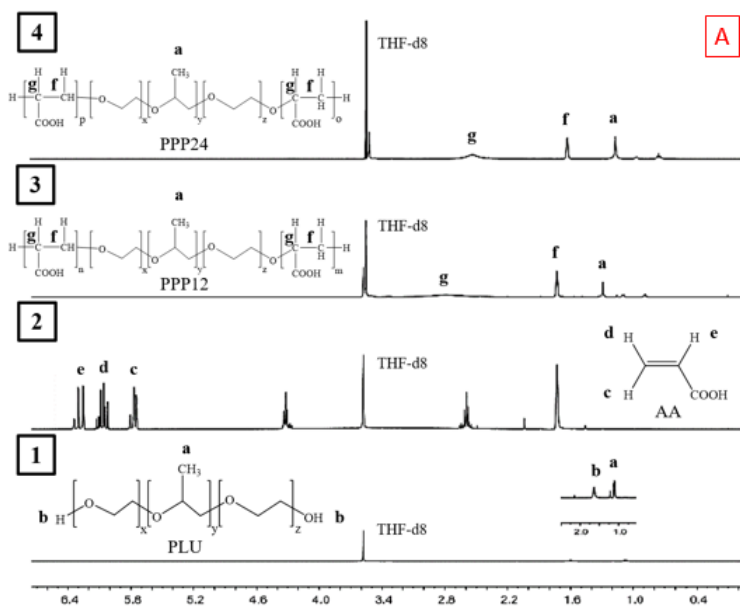


Figura II.18. (A) Espectros ¹H-RMN de PLU (1), AA (2), PPP12 (3) y PPP24 (4) en THF-d₈ a 400 MHz. **(B)** Espectros ATR-FTIR de PLU, AA, PPP12 y PPP24.

A partir de la integración de los picos característicos de PLU y AA, en las posiciones 1.1 ppm y 2.2–2.8 ppm, respectivamente, fue posible determinar el peso molecular aproximado de los polímeros obtenidos, que fue de 11671 kDa y de 24322 kDa. Teniendo en cuenta los pesos moleculares de ambos, los polímeros PPP serán denominados PPP12 (12 kDa) y PPP24 (24 kDa) de ahora en adelante.

Con respecto a los espectros FTIR, se observaron claras diferencias entre los cuatro compuestos (PLU, AA, PPP12 y PPP24) (**Figura II.18 B**). En la región de 3600–3400 cm^{-1} se puede observar una banda ancha, para los espectros de AA, PPP12 y PPP24, correspondiente al modo vibracional νOH , del ácido carboxílico. En la región de 3000–2800 cm^{-1} se observan bandas más estrechas, atribuidas a los modos vibracionales νCH de los cuatro compuestos investigados. En la región 1713 cm^{-1} se visualiza el modo vibracional $\nu\text{C}=\text{O}$ del PPP24, y a 1702 cm^{-1} , el del PPP12. Como los grupos carbonilos involucrados en la formación de puentes de hidrógeno absorben a menores números de onda, el corrimiento de la banda del $\nu\text{C}=\text{O}$ de PPP12 hacia menores números de onda indica la presencia de una red de puentes de hidrógeno mucho más fuerte para este polímero. El grupo de bandas a 1400 cm^{-1} puede ser atribuido al modo vibracional δCH , presente en los cuatro compuestos. La banda observada a 1095 cm^{-1} corresponde al modo vibracional δCOC de PLU, también observado en PPP12 y PPP24 (**Figura II.18 B**).

II.3.2.2 Evaluación de los parámetros de encapsulación

II.3.2.2.1 Determinación del potencial ζ

En la **Figura II.19 (A y B)** se presenta la evolución de la carga superficial de las bacterias encapsuladas luego de incorporar cada capa de polímero. Si bien ambas cepas presentaron un potencial ζ basal negativo, este valor fue considerablemente más negativo para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 que para *L. plantarum* CIDCA 83114. Este comportamiento puede asociarse al carácter hidrofóbico de las cepas. En este sentido, estudios previos realizados en el grupo de trabajo han establecido una correlación entre los valores de potencial ζ y la hidrofobicidad de las cepas. Así, la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114, que presenta valores bajos de potencial ζ , es una cepa hidrofílica (hidrofobicidad cercana a 0) (Golowczyc, 2008). Por el contrario, la cepa *L.*

delbrueckii subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 presenta una hidrofobicidad más elevada y valores más negativos de potencial ζ .

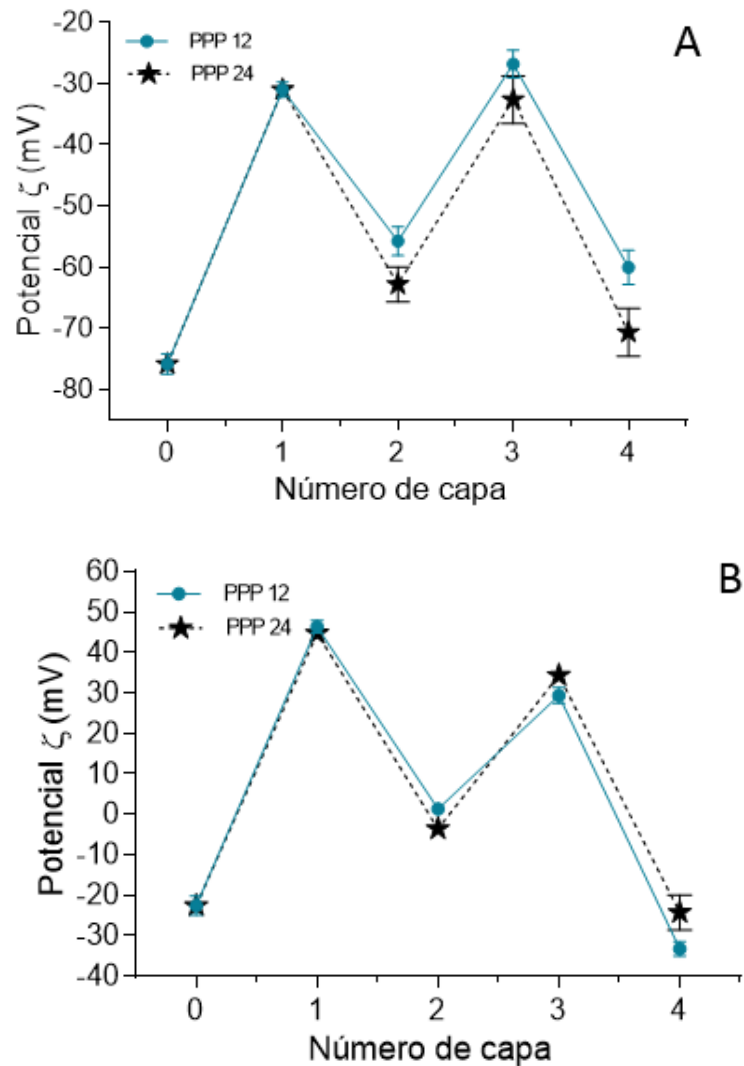


Figura II.19. Valores de potencial ζ obtenidos luego de la deposición de cada capa de polímero. **(A)**. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 y **(B)**. *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114.

Teniendo en cuenta que la superficie bacteriana tiene carga negativa, la primera capa depositada fue de quitosano, con carga positiva al pH de trabajo. Toda vez que se adicionó una capa de quitosano, los valores de potencial ζ fueron menos negativos (Figura II.19 A) o positivos (Figura II.19 B) en función de los valores basales. Por el contrario, toda vez que se adicionaron capas de PPP12 o PPP24, los valores de potencial ζ se hicieron más negativos (Figura II.19 A,B). Esta alternancia entre valores más positivos y más negativos puede considerarse como prueba de un correcto ensamblaje

de las capas de los polímeros sobre la superficie. Otros autores observaron variaciones de potencial ζ similares al agregar capas de diferentes polielectrolitos. En este sentido, Elizarova y Luckam (2017) estabilizaron nanoemulsiones por medio de la encapsulación LbL. Para ello, adicionaron ocho capas alternando polielectrolitos con carga positiva y negativa, dando origen a gráficos en forma de *zig-zag*, similares a los obtenidos en este trabajo de tesis.

II.3.2.2.2. Parámetros de crecimiento

Para evaluar el efecto de la encapsulación LbL sobre el crecimiento bacteriano, se realizaron cinéticas de crecimiento luego de depositar cada capa, y los resultados se compararon con los de los microorganismos no encapsulados (controles) (**Figura II.20**). Los datos obtenidos se ajustaron de acuerdo a la ecuación (2):

$$Abs(t) = \frac{Abs_f - Abs_0}{1 + e^{-ct^p}} + Abs_0 \quad \text{Ecuación 2}$$

donde t es el tiempo en horas, Abs_0 es la absorbancia a 600 nm a tiempo 0, Abs_f es la absorbancia a 600 nm una vez alcanzada la fase estacionaria, c es el tiempo en el punto de inflexión y p es un factor de ajuste exponencial. El tiempo de la fase *lag* se calculó como la intersección entre Abs_0 y la tangente en $t = c$. La velocidad de crecimiento durante la fase exponencial se calculó como la pendiente de la recta en dicha fase. Los parámetros de crecimiento para todas las cinéticas se presentan en las **Tablas II.5 y II.6**. La deposición de las capas de quitosano y PPP incrementó los tiempos *lag* tanto para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 como para *L. plantarum* CIDCA 83114, independientemente del número de capas depositadas sobre los microorganismos. Para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 se observaron tres cinéticas de crecimiento diferentes: luego de depositar la primera capa de quitosano [(CHI/PPP) 1/0], el tiempo *lag* aumentó 2.8 horas con respecto al de las bacterias sin encapsular. Las bacterias recubiertas con dos [(CHI/PPP) 1/1] y tres capas [(CHI/PPP) 2/1] mostraron mayores aumentos en sus tiempos *lag*, alcanzando 12.0 horas cuando se usó PPP12, y 14.3 horas cuando se usó PPP24. El tercer perfil observado fue el de las bacterias encapsuladas con cuatro capas [(CHI/PPP) 2/2], que presentó tiempos *lag* aún mayores, tanto para PPP12 como para PPP24 (**Figura II.20 y Tabla II.5**). Un dato relevante fue que a mayor tiempo *lag*, mayor velocidad de crecimiento. En particular, la velocidad de crecimiento de las

bacterias recubiertas con cuatro capas [(CHI/PPP) 2/2] fue aproximadamente el doble que la de las bacterias no encapsuladas (controles) (**Tabla II.5**).

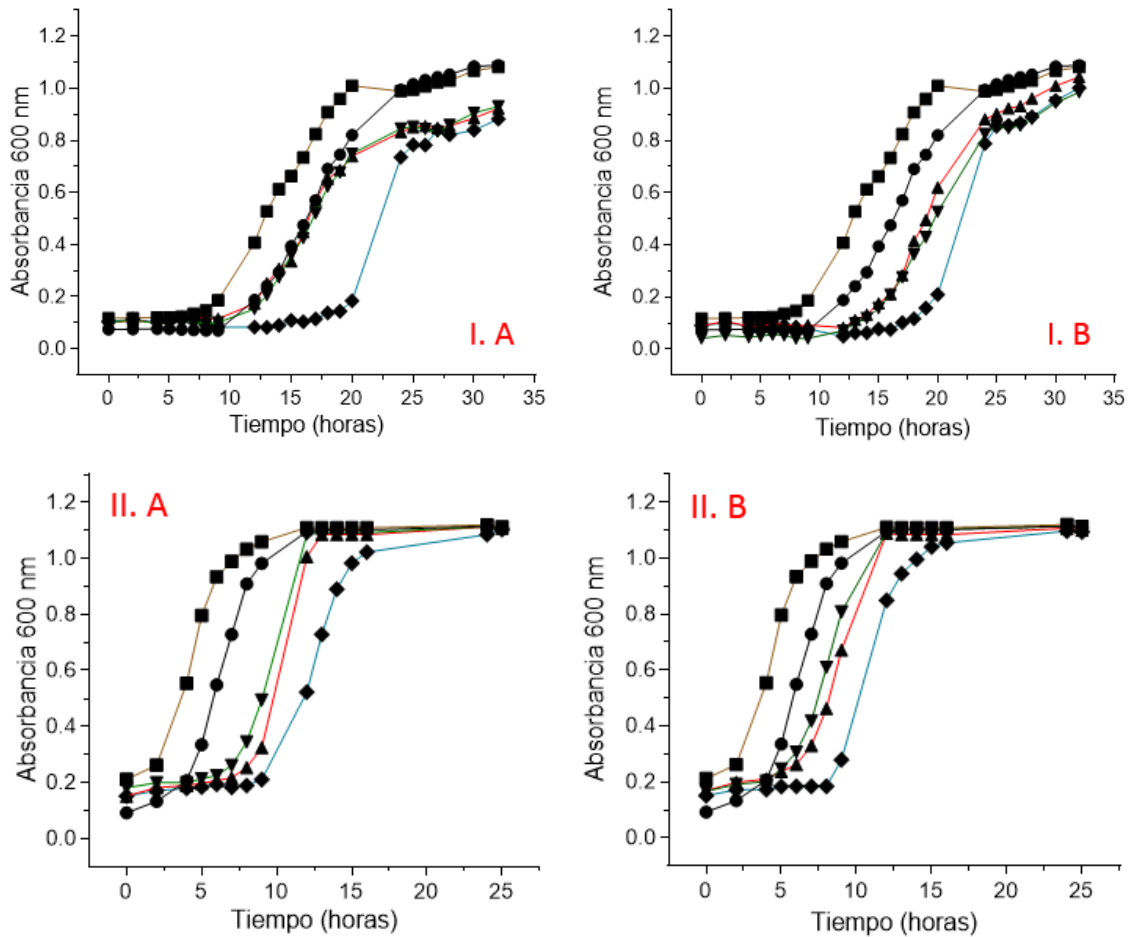


Figura II.20. Cinética de crecimiento de (I) *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 y (II) *L. plantarum* CIDCA 83114, crecidos en MRS. A. Bacterias encapsuladas con CHI y PPP12; B. Bacterias encapsuladas con CHI y PPP24. Cuadrados: bacterias no encapsuladas; círculos: bacterias con una capa de quitosano; triángulos invertidos: bacterias con una capa de quitosano y una de polímero; triángulos: bacterias con dos capas de quitosano y una de polímero; rombos: bacterias con dos capas de quitosano y dos de polímero.

En el caso de *L. plantarum* CIDCA 83114 se observaron parámetros diferentes. Si bien los tiempos *lag* aumentaron con el aumento de capas depositadas, este aumento no fue tan drástico como en el caso de la otra cepa. Al depositar la primera capa de quitosano [(CHI/PPP) 1/0], el tiempo *lag* aumentó 2.5 horas con respecto al de las bacterias no encapsuladas, y al depositar las capas restantes, el aumento del tiempo *lag* fue gradual, sin diferencias significativas entre ambos polímeros. Con respecto a la velocidad de crecimiento (**Tabla II.6**), los valores fueron similares en todos los casos,

con excepción de las bacterias encapsuladas con 4 capas del polímero de menor peso molecular (PPP12), que fueron las que más tiempo demoraron en crecer una vez alcanzada la fase exponencial.

Tabla II.5. Parámetros de crecimiento de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 crecido en MRS luego de depositar cada una de las capas (quitosano y PPP).

Capas	Tiempo <i>lag</i> (horas)	Velocidad de crecimiento (unidades de absorbancia/h)	R ²
Microorganismos no encapsulados	8.4	0.18	0.995
CHI/PPP12 1/0	11.2	0.17	0.999
CHI/PPP12 1/1	12.0	0.21	0.996
CHI/PPP12 2/1	12.0	0.20	0.996
CHI/PPP12 2/2	19.5	0.38	0.997
CHI/PPP24 1/0	11.2	0.17	0.999
CHI/PPP24 1/1	14.3	0.17	0.997
CHI/PPP24 2/1	14.8	0.21	0.996
CHI/PPP24 2/2	19.5	0.32	0.995

Tabla II.6. Parámetros de crecimiento de *L. plantarum* CIDCA 83114 crecido en MRS luego de depositar cada una de las capas (quitosano y PPP).

Capas	Tiempo <i>lag</i> (horas)	Velocidad de crecimiento (unidades de absorbancia/h)	R ²
Microorganismos no encapsulados	1.8	0.29	0.991
CHI/PPP12 1/0	4.3	0.29	0.996
CHI/PPP12 1/1	7.6	0.29	0.997
CHI/PPP12 2/1	8.2	0.28	0.981
CHI/PPP12 2/2	9.1	0.17	0.984
CHI/PPP24 1/0	4.3	0.29	0.996
CHI/PPP24 1/1	6.8	0.28	0.981
CHI/PPP24 2/1	7.2	0.28	0.983
CHI/PPP24 2/2	8.4	0.31	0.990

Los parámetros cinéticos brindaron información relevante (**Figura II.20 y Tabla II.5, II.6**). El aumento de los tiempos *lag* con el aumento de capas depositadas indica la presencia de una mayor barrera frente al ambiente, lo cual ralentiza el acceso a los nutrientes presentes en el medio, ya que los polímeros depositados deben rehidratarse para permitir la liberación de las bacterias al medio. Esto se traduce en un aumento de los tiempos *lag*.

Los datos fueron similares a los informados por otros autores (Anselmo *et al.*, 2016; Jonas *et al.*, 2018; Rybkin *et al.*, 2019). Rybkin *et al.* (2019) encapsularon células de *Escherichia coli* con capas de poliestireno de sulfato sódico como capa negativa y polietilenimina como capa positiva. Los autores informaron que luego de agregar 2 o 3 capas, hubo un aumento de los tiempos *lag* de 2.5 horas con respecto a las bacterias sin encapsular y un aumento de 5 horas cuando luego de agregar 4 capas. Por otra parte, Jonas *et al.* (2018) encapsularon bacterias de *Staphylococcus epidermis* con capas de quitosano/alguinato y capas de poli (clorhidrato de alilamina)/poliestireno de sulfato, como capas positivas y negativas, respectivamente. Los autores informaron aumento de la fase *lag* de hasta 30 horas luego de agregar 3 capas. Aaron *et al.* (2016) informaron aumentos de 10 horas de la fase *lag* de *Bacillus coagulans* cuando fue encapsulada con seis capas de polímeros, tres capas de quitosano y tres capas de alginato.

II.3.2.3. Efecto de la liofilización sobre las bacterias encapsuladas

Se estudió el efecto de la encapsulación LbL y su posterior liofilización sobre la viabilidad de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 y *L. plantarum* CIDCA 83114 (**Figura II.21**). Los microorganismos encapsulados y liofilizados en ausencia de agente protector mostraron una pérdida significativa de la viabilidad, en particular *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333, que es una cepa mucho más sensible (Romano *et al.*, 2016; Tymczyszyn *et al.*, 2008, 2011, 2012). Sin embargo, como el objetivo de esta parte del capítulo fue investigar el efecto del PPP sobre la encapsulación LbL, se decidió usar sacarosa como protector, ya que es un compuesto con demostrada capacidad protectora (Tymczyszyn *et al.*, 2007a). De esta manera fue posible descartar cualquier efecto perjudicial intrínseco de la cepa en estudio frente al proceso de liofilización.

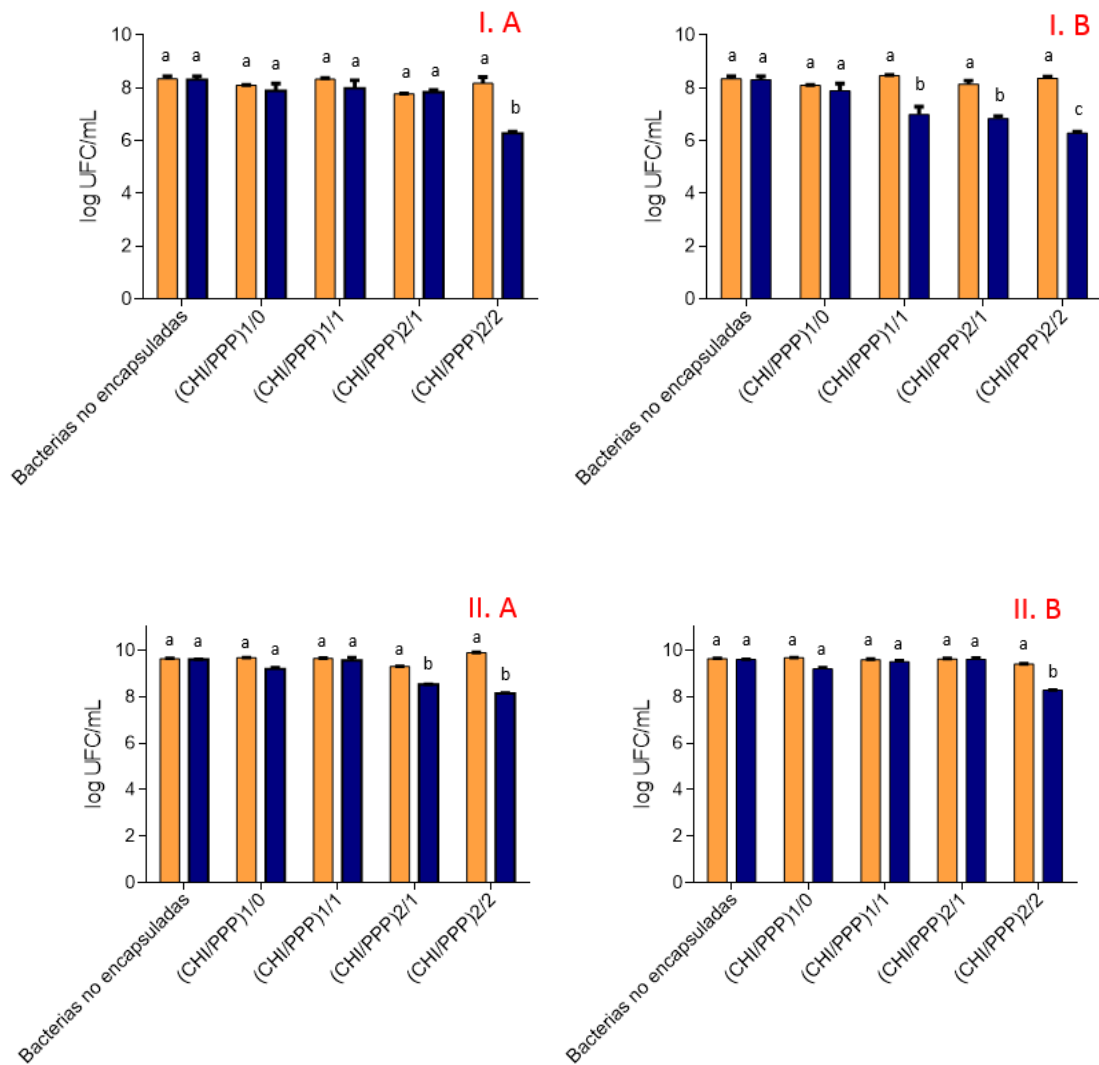


Figura II.21. Log UFC/mL de (I). *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 y (II). *L. plantarum* CIDCA 83114, encapsulados y no encapsulados, antes y después de la liofilización en presencia de sacarosa 20 % p/v. Las barras naranjas indican la viabilidad bacteriana antes de liofilizar y las barras azules, después de dicho proceso. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. (A) Bacterias encapsuladas con quitosano y PPP12. (B) Bacterias encapsuladas con quitosano y PPP24.

La viabilidad de las bacterias encapsuladas con cuatro capas de polímeros antes de liofilizar no fue significativamente diferente a la de las bacterias no encapsuladas ($p < 0.05$) (barras naranjas en la Figura II.21). Asimismo, la viabilidad de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 encapsulada [(CHI / PPP12) 1/0], [(CHI/PPP12) 1/1] y [(CHI/PPP12) 2/1] antes y después de liofilizar no fue significativamente diferente ($p > 0.05$). Sin embargo, al depositar la segunda capa de PPP12 [(CHI/PPP12) 2/2], la viabilidad disminuyó significativamente de 8.16 ± 0.09 a 6.28 ± 0.06 unidades logarítmicas ($p < 0.05$). En el caso de las bacterias liofilizadas encapsuladas con el polímero de mayor

peso molecular (PPP24) mostraron una disminución significativa de la viabilidad bacteriana después de depositar la primera capa de PPP24 [(CHI/PPP24) 1/1] ($p < 0.05$) (**Figura II.21 I.B**).

Con respecto a *L. plantarum* CIDCA 83114, no se observaron diferencias significativas para las muestras encapsuladas [(CHI / PPP12) 1/0], [(CHI/PPP12) 1/1] antes y después de liofilizar. Sin embargo, al depositar la tercera capa de polímero [(CHI/PPP12) 2/1], se evidenció una disminución de la viabilidad, que fue aún mayor cuando se depositó la cuarta (**Figura II.21 A**). Con el polímero de mayor peso molecular (PPP24) sólo se observó una disminución significativa de la viabilidad luego de la deposición de la última capa de polímero, en cuyo caso la viabilidad bacteriana varió de 9.41 ± 0.01 a 8.27 ± 0.02 unidades logarítmicas ($p < 0.05$) (**Figura II.21 B**).

II.3.2.4. Análisis por microscopía confocal

La permeabilidad de las membranas bacterianas luego de depositar las diferentes capas de los polímeros fue analizada por microscopía confocal. Este ensayo fue realizado solamente para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 debido a su mayor sensibilidad durante el proceso de liofilización. En la **Figura II.22** se observa el grado de penetración de los dos marcadores utilizados, FITC-inulina (marcador alto peso molecular) y yoduro de To-Pro[®]-3 (tinción de DNA de bajo peso molecular). Las bacterias no encapsuladas fueron marcadas por ambas sondas, tal como puede visualizarse en las imágenes combinadas, donde la fluorescencia verde y roja (correspondiente a FITC-inulina y yoduro de To-Pro[®]-3, respectivamente) indica que las membranas celulares son permeables a las moléculas de bajo y alto peso molecular (**Figura II.22 A**).

En lo que respecta a las bacterias encapsuladas, la deposición de una o más capas de quitosano y PPP dificultó la penetración del colorante FITC-inulina de mayor peso molecular, pero el marcador de menor peso molecular (yoduro de To-Pro[®]-3) sí pudo atravesar las membranas (**Figura II.22 B y II.22 C**). En estos últimos casos, las imágenes obtenidas mostraron una fluorescencia verde fuera de las células y una fluorescencia roja dentro de las bacterias. Otro dato importante para remarcar es que a pesar de que las bacterias encapsuladas fueron capaces de incorporar yoduro de To-Pro[®]-3, la deposición de un número mayor de capas [*i.e.*, 3 como en (CHI/PPP12) 2/1)], disminuyó

ligeramente su penetración, tal como puede visualizarse a través de la disminución de la intensidad de color en las imágenes combinadas (**Figura II.22 B y II.22 C**).

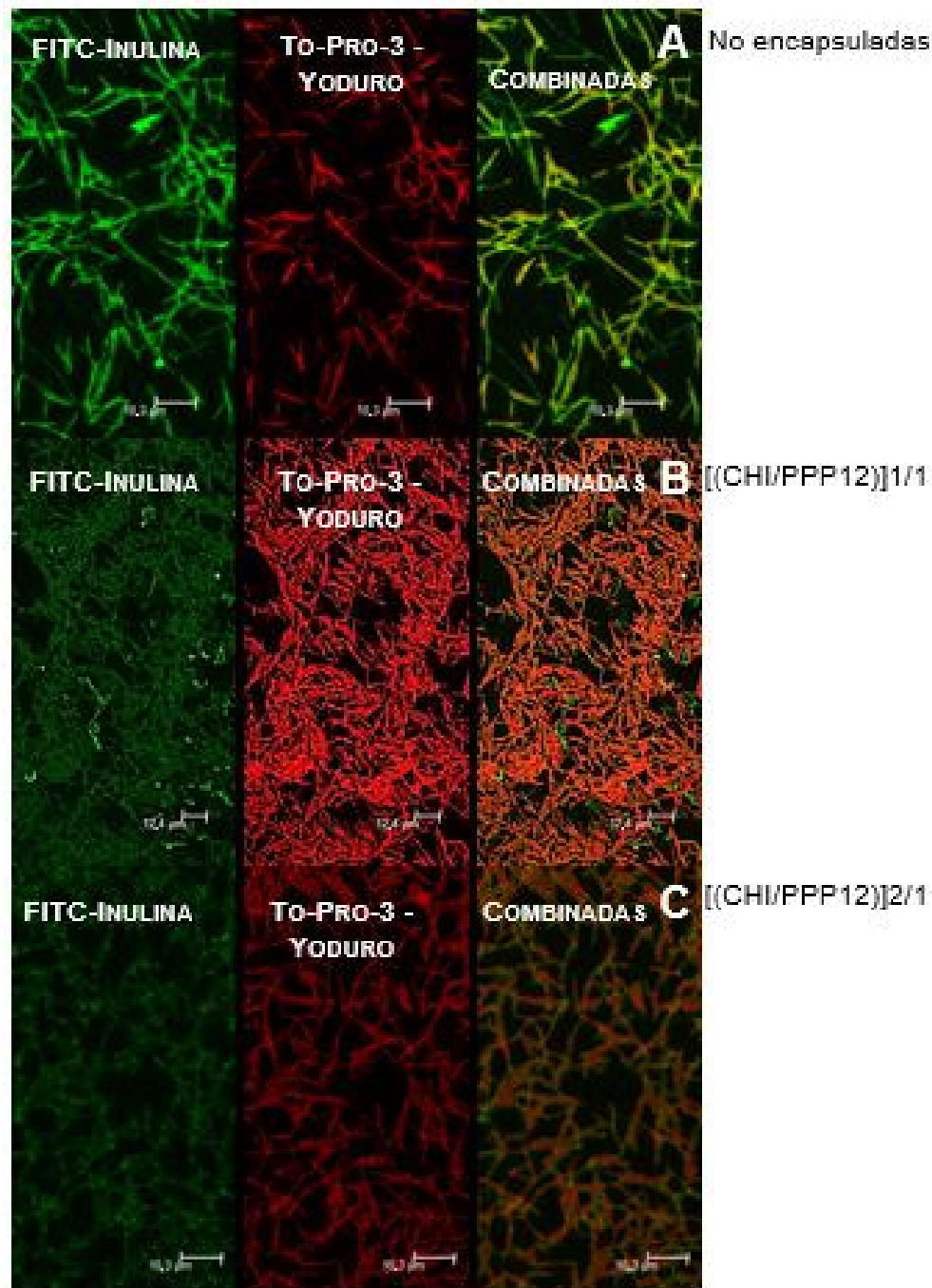


Figura II.22. Imágenes de microscopía confocal de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333. Bacterias no encapsuladas (**A**), bacterias encapsuladas con una capa de quitosano y PPP12 [CHI/PPP12] 1/1 (**B**), y bacterias encapsuladas con dos capas de quitosano y una de PPP12 [CHI/PPP12] 2/1 (**C**). En el panel izquierdo se muestra la fluorescencia verde, en el central, la fluorescencia roja, y en el de la derecha, las imágenes combinadas.

Las bacterias encapsuladas y no encapsuladas mostraron resultados similares con respecto a la marcación con sondas de bajo peso molecular (ioduro de To-Pro[®]-3), lo que indica la permeabilidad para las moléculas de ese tamaño. El ioduro de To-Pro[®]-3 tiene un peso molecular de 671.42 y por lo tanto, las bacterias encapsuladas son permeables a compuestos de peso molecular menor, tales como los monosacáridos, disacáridos, aminoácidos y di o tripéptidos, que constituyen la principal fuente de carbono y energía para el crecimiento bacteriano. Esto explica la capacidad de los microorganismos encapsulados para crecer en medio de cultivo. Por el contrario, esto previene la internalización de compuestos de mayor peso molecular. De esta manera, la encapsulación podría actuar como una barrera para prevenir la internalización de bacteriófagos, bacteriocinas o enzimas potencialmente perjudiciales.

II.3.2.5. Simulación de la digestión gastro-intestinal

La exposición de los microorganismos encapsulados a condiciones gastro-intestinales simuladas permitió analizar la eficiencia de los polímeros utilizados en la liberación controlada de las bacterias una vez ingeridas (**Figura II.23**). Luego de someter a *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 no encapsulado a condiciones gástricas e intestinales simuladas, su viabilidad disminuyó significativamente de 8.35 ± 0.10 a 4.23 ± 0.07 y 4.95 ± 0.01 log UFC/mL, respectivamente (**Figura II.23 I.A y I.B**). Para las bacterias encapsuladas sólo con quitosano [(CHI/PPP) 1/0] se observó un comportamiento similar. El agregado de PPP12 y PPP24 protegió a los microorganismos del ambiente perjudicial del tracto gastrointestinal. No se observó una disminución significativa de la viabilidad de los microorganismos encapsulados y liofilizados con [(CHI/PPP) 1/1], [(CHI/PPP) 2/1] y [(CHI/PPP) 2/2] y expuestos a condiciones gástricas e intestinales, en comparación con los microorganismos encapsulados antes de la exposición. Este comportamiento se observó tanto para el polímero PPP12 como para el PPP24 (**Figura II.23 I.A y I.B**).

Con respecto a *L. plantarum* CIDCA 83114, se observó una gran resistencia de la bacteria no encapsulada frente a las condiciones gastrointestinales. Las bacterias encapsuladas con una sola capa de quitosano [(CHI/PPP) 1/0] mostraron pérdida de viabilidad (**Figura II.23 II.A y II.B**). Al igual que en el caso de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333, el agregado de PPP12 y PPP24 mejoró la protección de los microorganismos.

En este sentido, las bacterias encapsuladas con 2 y 3 capas, [(CHI/PPP) 1/1] y [(CHI/PPP) 2/1], presentaron una viabilidad significativamente más elevada que las bacterias no encapsuladas o recubiertas con una sola capa de quitosano [(CHI/PPP) 1/0] (**Figura II.23**). Las bacterias encapsuladas con 4 capas [(CHI / PPP) 2/2] se comportaron de manera similar. Sin embargo, el aumento del número de capas dio lugar a mayores tiempos *lag* (**Figura II.20**).

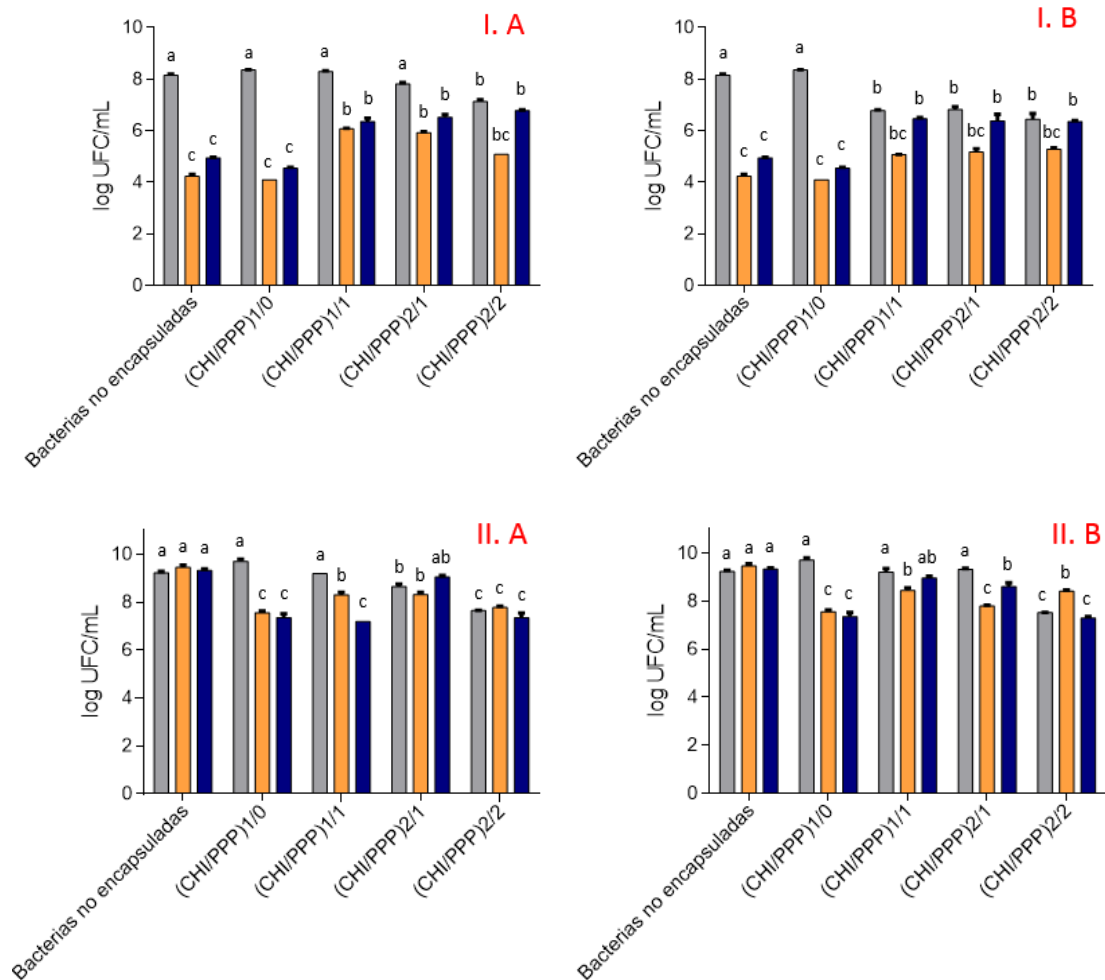


Figura II.23 Log UFC/mL de (I). *L. delbrueckii subsp bulgaricus* CIDCA 333 liofilizado y (II). *L. plantarum* CIDCA 83114, encapsulados y no encapsulados, después de la exposición a condiciones gástricas e intestinales. Las barras grises indican las UFC/mL de microorganismos liofilizados, antes de la exposición. Las barras naranja representan los microorganismos liofilizados sometidos a condiciones gástricas, y las barras azules, a condiciones intestinales. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). (A) Bacterias encapsuladas con quitosano y PPP12. (B) Bacterias encapsuladas con quitosano y PPP24.

A partir de los datos obtenidos, es posible concluir que los encapsulados [(CHI / PPP) 1/1] y [(CHI / PPP) 2/1], fueron los que presentaron una mejor capacidad de proteger a los microorganismos frente a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal. La ligera disminución de la viabilidad bacteriana después de exponer los encapsulados a las condiciones gástricas reflejó la capacidad del PPP para resistir al ambiente ácido. De esta manera, las cápsulas no pueden liberar su contenido en el ambiente ácido del estómago, y una vez alcanzadas las condiciones intestinales, son capaces de liberar su contenido gracias a la solubilidad del PPP en medios alcalinos. Esto explica la mayor viabilidad en el medio intestinal (**Figura II.23**).

Otros autores informaron datos similares cuando encapsularon bacterias con diferentes capas de polímeros (Anselmo *et al.*, 2016). Anselmo *et al.* (2016) informaron la encapsulación de *Bacillus coagulans* con cinco formulaciones diferentes: i. una sola capa de quitosano; ii. Una capa de quitosano y una de alginato; iii. Dos capas de quitosano y dos de alginato; iv. Una capa de quitosano y una capas de un polímero entérico (L100), por sus propiedades para resistir ambientes ácidos; v. dos capas de quitosano y dos capas del polímero entérico. Los autores informaron una pérdida significativa de la viabilidad bacteriana en condiciones gástricas, cuando la bacteria sólo contaba con una capa de quitosano, con un descenso de 6 log UFC/mL. En el caso iv y v, en donde las bacterias fueron encapsulas con quitosano y el polímero entérico, informaron una mayor protección frente a las condiciones gástricas, con un descenso de la viabilidad de 3.5 y 1 log de UFC/mL, cuando las bacterias estaban recubiertas con 2 y 4 capas, respectivamente. Sin embargo cuando se expusieron a condicones intestinales, mostraron un significativo descenso de la viabilidad, de 4.5 log UFC/mL, tanto para 2 como para 4 capas. La combinación de quitosano/alginato fue la que mayor protección otorgó a las bacterias, con un descenso de la viabilidad de 3.5 log UFC/mL cuando las bacterias fueron encapsuladas con 2 capas, y de 1 log UFC/mL, cuando se encapsularon con 4 capas, en condiciones gástricas. Por su parte, en condiciones intestinales, los autores informaron un descenso de 4 y 1.5 log UFC/mL, para 2 y 4 capas de quitosano/alginato, respectivamente.

Un análisis integrado de las cinéticas de crecimiento, la viabilidad antes y después de la liofilización y después de la exposición a condiciones gástricas e intestinales simuladas (**Figura II.21 y II.23**) permitió obtener mayor información acerca del efecto de

cada capa de polielectrolito sobre las bacterias en el proceso de encapsulación. Las bacterias encapsuladas sólo con una capa de quitosano [(CHI/PPP) 1/0] fueron las que presentaron el menor tiempo *lag* y no se observaron diferencias significativas después de liofilizar (**Figura II.20**). Sin embargo, fueron las más afectadas por las condiciones gastrointestinales (**Figura II.23**). Por su parte, las bacterias encapsuladas con las cuatro capas de polímeros [(CHI/PPP) 2/2] presentaron los mayores tiempos *lag* pero la velocidad de crecimiento fue más elevada para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 (**Figura II.20 y Tabla II.5**). Las bacterias encapsuladas con 4 capas de polímeros presentaron mayores barreras, por lo que necesitaron un mayor tiempo de hidratación, dando lugar a tiempos *lag* mayores (19.5 horas para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 y 9.1 horas para *L. plantarum* CIDCA 83114). Sin embargo, en el caso de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333, una vez que los microorganismos fueron liberados al medio de cultivo, crecieron más rápido (0.32–0.38 unidades de absorbancia/hora, **Tabla II.5**). A pesar de esto, los microorganismos encapsulados en estas condiciones fueron más susceptibles al proceso de liofilización (**Figura II.21**). Las bacterias encapsuladas con dos o tres capas, [(CHI/PPP) 1/1] y [(CHI/PPP) 2/1], mostraron tiempos *lag* y velocidades de crecimiento muy similares (**Tabla II.5 y II.6**) pero el efecto de PPP12 y PPP24 fue diferente. Los microorganismos encapsulados con PPP12 mostraron mejores resultados que PPP24 durante el proceso de liofilización (**Figura II.21**). Estos resultados se podrían asociar con la red de puentes de hidrógeno más fuerte que presentó el PPP12 (**Figura II.18 B**), lo que da lugar a un material más resistente, que podría estar relacionado con la mayor resistencia de las bacterias encapsuladas con PPP12 al proceso de liofilización (**Figuras II.21**).

II.3.2.6. Evaluación de la toxicidad de los polímeros frente a células intestinales

A la luz de todos los datos obtenidos en el desarrollo de este capítulo, la encapsulación con 2 y 3 capas de polímeros [(CHI/PPP) 1/1] y [(CHI / PPP) 2/1], demostró ser la condición más adecuada para ejercer un efecto protector sobre las bacterias, tanto en los procesos de deshidratación como en la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas. Además, el uso de menos capas requiere menores tiempos de encapsulación y menor uso del material. Por esta razón, se realizaron ensayos

adicionales para evaluar la posible toxicidad que podrían tener los polímeros frente a células intestinales (**Figura II.24**). Este ensayo fue realizado solamente para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 debido a que fue la cepa que presentó mayor sensibilidad en los ensayos anteriormente descritos.

Los ensayos de MTT revelaron que ninguno de los dos polímeros (quitosano y PPP) fueron citotóxicos para la línea celular Caco-2/TC7. De hecho, las monocapas incubadas durante 24 horas con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 encapsuladas no mostraron una disminución significativa de la viabilidad en ninguno de los casos (**Figura II.24**).

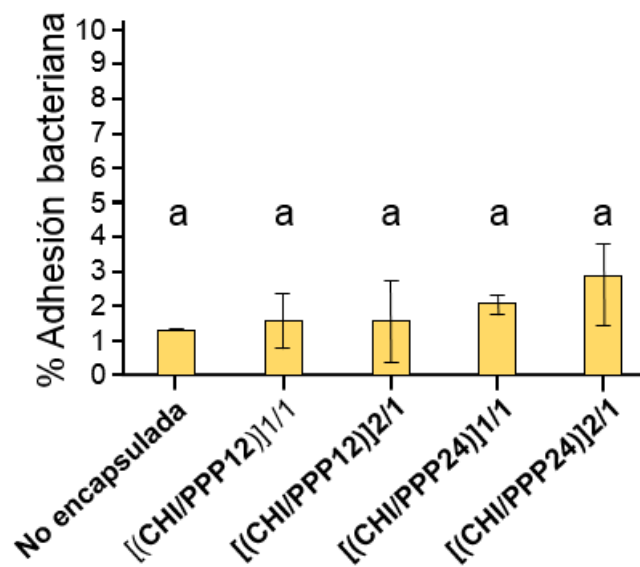


Figura II.24. Ensayo de MTT para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 no encapsuladas y encapsuladas con 2 y 3 capas de polímeros [(CHI/PPP) 1/1] y [(CHI / PPP) 2/1] frente a células intestinales Caco-2/TC7.

Conclusiones

- La técnica LbL demostró ser una técnica eficiente para encapsular a *L. plantarum* CIDCA 83114 y *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 con capas de quitosano y polímeros de PPP12 y PPP24.
- Los encapsulados con dos o tres capas, [(CHI/PPP) 1/1] y [(CHI/PPP) 2/1], demostraron ser los más adecuados para proteger las bacterias. En efecto, las bacterias encapsuladas con 2 y 3 capas mostraron tiempos *lag* menores, no mostraron descensos significativos de viabilidad luego de la liofilización y estuvieron mejor protegidas cuando fueron expuestas a condiciones gastro-intestinales simuladas.
- Si bien ambos polímeros presentaron efectos protectores sobre las bacterias, el polímero PPP12 mostró mejores resultados al momento de liofilizar, observándose menores descensos de la viabilidad bacteriana en comparación con PPP24.
- Ninguno de los polímeros (quitosano y PPP) mostró ser tóxico para la línea celular Caco-2/TC7, por lo que se los puede considerar como seguros.

Parte B

II.3.2. Resultados

II.3.2.1 Encapsulación de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 en emulsiones W/O por microfluídica

A pesar de que ambos polímeros (PPP12 y PPP24) fueron eficientes para encapsular y proteger a los microorganismos, en esta parte del capítulo sólo se utilizó el polímero PPP12 debido a que es menos viscoso y más fácil de utilizar a nivel experimental. Asimismo, teniendo en cuenta que en diversos estudios se utiliza el alginato como principal agente encapsulante (Bazban-Shotobani *et al.*, 2016; Hâti *et al.*, 2016; Marquis *et al.*, 2015, Utech *et al.*, 2015; Mazutis *et al.*, 2015) se decidió incorporarlo y comparar su eficiencia con la del polímero PPP12.

Los tamaños de los canales a través de los cuales se bombearon las fases oleosa (continua) y acuosa (dispersa) fueron de gran relevancia al momento de formular las emulsiones. Así, en una primera instancia se utilizaron *chips* de microfluídica con diámetros de canal de 20 y 50 μm , sin resultados favorables. Con estos diámetros, la máxima concentración de PPP12 que pudo ser utilizada fue de 0.5% p/v, sin tener en cuenta el agregado de alginato. Además, a medida que se hicieron fluir las fases (especialmente la fase dispersa) los canales se fueron obstruyendo, llegando a romperse, lo que impidió su reutilización posterior.

La utilización de *chips* de mayor diámetro (200 μm) presentó diversas ventajas, tales como:

- A. poder usar velocidades mayores de flujo;
- B. poder utilizar concentraciones más altas de polímero, alginato y emulsionante;
- C. la posibilidad de hacer combinaciones de soluciones acuosas (polímero y alginato);
- D. en comparación con los *chips* de menor tamaño, no hubo problemas de obstaculización de chips en el transcurso de la corrida, quedando aptos para usos posteriores.

Las condiciones de corrida fueron optimizadas en tiempo real configurando las velocidades de flujo de las fases durante cada uno de los ensayos hasta obtener gotas uniformes y constantes. Además, los sistemas microfluídicos pueden controlarse de

manera directa, observando al microscopio a medida que se forman las emulsiones. En la **Tabla II.7** se presentan las relaciones de velocidades entre las diferentes fases para todos los ensayos realizados (I, II, III y IV), y el control sin polímero.

Tabla II.7. Relación de velocidades de flujos entre la fase continua (oleosa) y las fases dispersas (acuosas)

Emulsiones W/O			
Ensayos	Fases	Flujos $\mu\text{l/h}$	Relación
Control	Dispersa	120	1:8
	Continua	960	
I	Dispersa	120	1:5
	Continua	600	
II	Dispersa 1	40	1:6
	Dispersa 2	60	
	Continua	600	
III	Dispersa	60	1:10
	Continua	600	
IV	Dispersa 1	40	1:6
	Dispersa 2	60	
	Continua	600	

En cada uno de los ensayos se observaron comportamientos diferentes al momento de formular las emulsiones, los cuales estuvieron determinados por la fuerza de corte al momento de formación de las gotas (Vinner *et al.*, 2017). Estas fuerzas de corte estuvieron determinadas por la formulación de las emulsiones y por las velocidades de flujo de las fases continua y dispersa. En los ensayos donde se utilizó alginato se observó un alargamiento de la fase dispersa (**Figura II.25**) en el punto donde se produce el corte y se forman las gotas. Este comportamiento ocurrió debido a las elevadas velocidades de flujo de la fase dispersa en comparación con la fase continua, que evita que la fase continua sea capaz de romper el flujo y formar las gotas. Vinner *et al.* (2017) observaron comportamientos similares, trabajando con combinaciones alginato-polímero Eudragit^R S100. Sin embargo, las velocidades de flujo de la fase dispersa o continua no son los únicos factores que provocaron este alargamiento de la

fase dispersa, ya que la concentración de alginato también es un factor determinante (Vinner *et al.*, 2017). Otros autores ensayaron la producción de gotas utilizando diferentes velocidades de flujo y concentraciones de alginato (Mazutis *et al.*, 2015), obteniendo una producción estable de gotas hasta el 2% (p/v) de alginato. Por encima de esta concentración la viscosidad de la solución de alginato es demasiado alta, haciendo que el proceso de producción de gotas sea inestable.

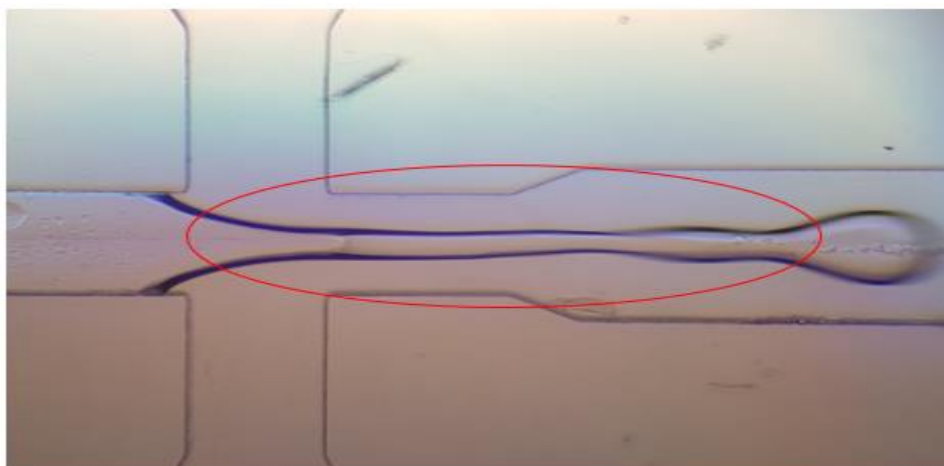


Figura II.25. Comportamiento de la fase dispersa a altas velocidades de flujo.

Con respecto a la relación de las velocidades de flujo entre las fases, se observaron diferencias, especialmente en aquellos ensayos en los que se utilizaron dispositivos microfluídicos de dos entradas (control, ensayos I y III) como el representado en el esquema de la **Figura II.14 A** de la sección II.2.2.11.1 de Materiales y métodos.

En estos tres casos la fase continua fue la misma, mientras que la fase dispersa fue diferente. La fase dispersa estuvo compuesta sólo por *L. plantarum* CIDCA 83114 y el marcador para el control, sólo por PPP12 para la ensayo I, y sólo por alginato para la ensayo III. La soluciones de PPP12 y alginato presentaron diferentes viscosidades, lo cual influyó al momento de establecer una velocidad que mantuviera un flujo de formación de gotas constante. En el caso de la formulación sólo con alginato (ensayo III) se necesitó una mayor relación de velocidades (velocidades más altas de fase continua o más bajas de fase dispersa) para lograr la existencia de un punto de corte y la formación de las gotas. De no darse esta situación, se observó nuevamente un alargamiento de la fase dispersa, tal como se mostró en la **Figura II.25**. En el caso del ensayo I, una relación fase

dispersa:fase continua de 1:5 permitió una formación constante de gotas. En el ensayo III (relación fase dispersa:fase continua 1:10) se obtuvieron resultados similares.

En el caso del control, al utilizar sólo agua, la fase dispersa no presentó las mismas viscosidades que las soluciones con alginato o polímero PPP12 y el flujo de velocidades de las fases (dispersa y continua) no fue un factor determinante a la hora de conseguir un flujo constante de formación de gotas, observándose sólo un cambio en los tamaños de las gotas al cambiar las velocidades de flujo. Para la relación de velocidades de flujo elegidas (1:8 fase dispersa:fase continua) se observó un flujo constante y estable, con gotas de tamaños similares a los observados en los ensayos I y III. Otros autores observaron comportamientos similares al cambiar las relaciones de flujo. Utech *et al.*, (2015) mantuvo constante la velocidad de flujo de la solución de alginato (fase dispersa), modificando la velocidad de flujo de la fase continua de 100 a 500 $\mu\text{L/h}$, lo que permitió disminuir el tamaño de la gota. Por su parte, Eun *et al.*, (2011) utilizaron vesículas lipídicas para encapsular compuestos biológicos, observando que al aumentar la fuerza de corte de la fase continua (por aumento de su velocidad de flujo) disminuye el tamaño de las gotas y aumenta la velocidad de formación de emulsiones.

Con respecto a los *chips* con tres puntos de entrada (**Figura II.14 B** de la sección II 2.2.11.1 de Materiales y métodos), se trabajó con dos fases dispersas (ensayos II y IV). En el ensayo II se utilizó una fase dispersa formada por *L. plantarum* CIDCA 83114, el polímero PPP12 2% y el marcador de 6-carboxy-fluoresceína, a la que se le agregó una segunda fase dispersa (alginato 1.5% p/v) a través de un canal distinto. Por su parte, en el ensayo IV, la posición de los polímeros se invirtieron, quedando la fase dispersa interna con el alginato, las bacterias y el marcador, y por fuera una fase dispersa formulada con PPP12 al 2% p/v. En ambos casos se utilizó la misma relación de flujos de velocidades (1:6), independientemente de si el PPP12 o el alginato se encontraban en la fase dispersa interna junto con las bacterias. Cuando se aumentó el flujo acuoso o se disminuyó el flujo oleoso, a través de la disminución de la relación de las velocidades, se observó un alargamiento de la fase dispersa, similar al mostrado en la **Figura II.25**.

En la **Figura II.26** se presentan las imágenes obtenidas por microscopía óptica, donde se observan dos sectores del *chip*:

A. sector del punto de encuentro de las fases (dispersa y continua) y lugar donde se genera la fuerza de corte y la formación de la gota, y

B. la parte del canal por donde se mueven las gotas formadas antes de llegar al punto de salida.

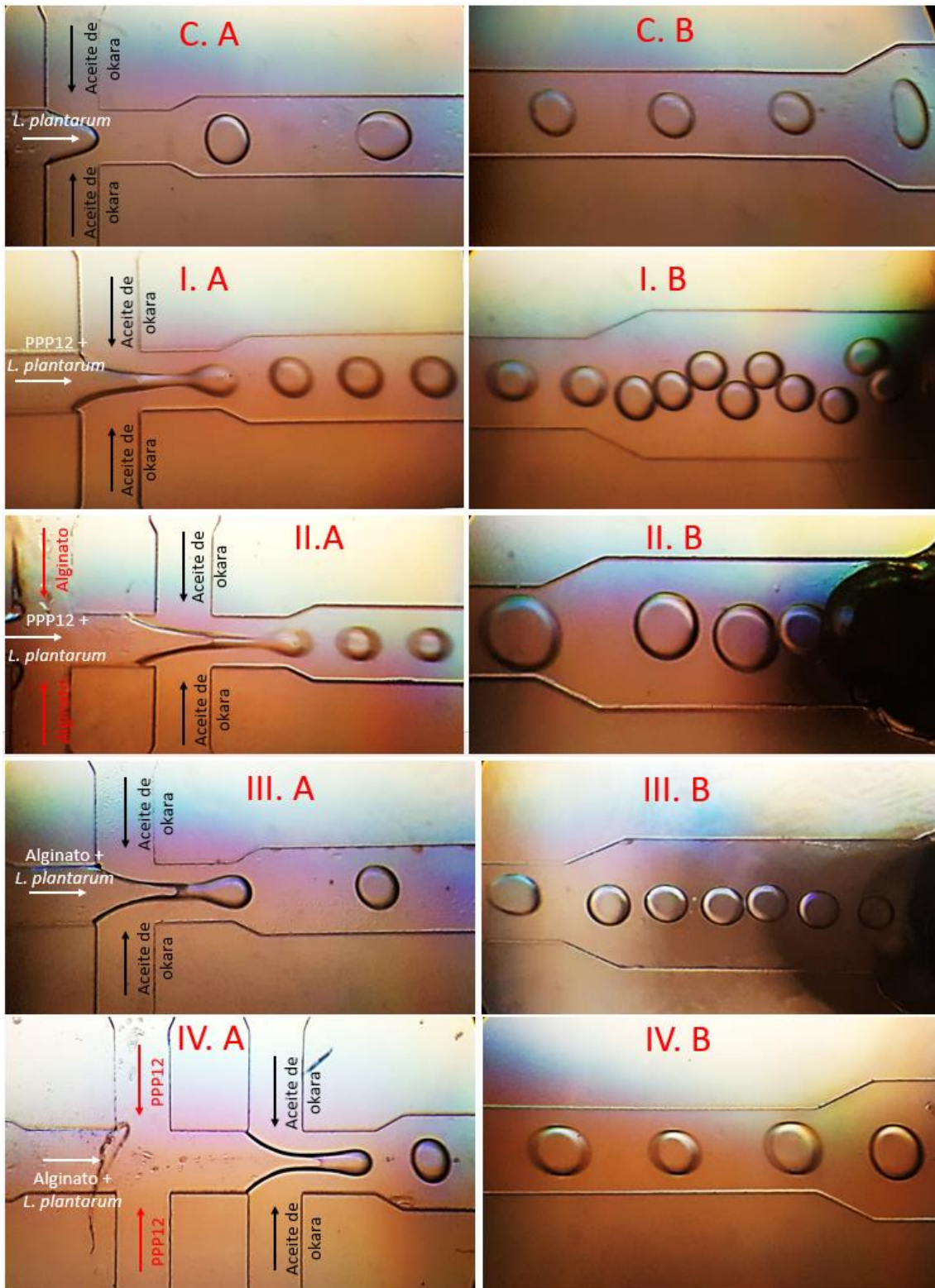


Figura II.26. Imágenes tomadas a partir de un microscopio conectado al equipo de microfluídica. Emulsión W/O obtenidas en cada uno de los ensayos, representadas como I, II, III, IV. **C.** Control. **A.** Sección donde se encuentran las fases, **B.** Sección final antes del punto de salida.

En la **Figura II.26** se puede observar las imágenes registradas por el cámara conectada al microscopio. Cuando las velocidades fueron las adecuadas (**Tabla II.7**) se generó un flujo constante de gotas en el punto de corte (punto de encuentro de las dos fases) como las observadas en la **Figura II.26 A**, y estas gotas fueron transportadas al canal del *chip* hasta el punto de salida (**Figura II.26 B**).

II.3.2.2. Microscopía de las emulsiones W/O

En la **Figura II.27** se presentan las emulsiones W/O frescas, obtenidas mediante el sistema de microfluídica. Las gotas de las emulsiones de todos los ensayos (I, II, III y IV) tuvieron formas esféricas, y alrededor de ellas se observó un anillo, que fue más notable en los ensayos II y IV posiblemente debido al uso de dos fases dispersas de manera sucesiva. Si bien el control también presentó emulsiones estables y esféricas, solo se observó una corteza fina en la parte externa.

En el interior de las emulsiones se observó a la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114 dispersa en la fase acuosa (**Figura II.27, flechas rojas**). Además, no se observó la presencia de *L. plantarum* CIDCA 83114 por fuera de las emulsiones, lo que confirma la correcta encapsulación de la bacteria. Barlow *et al.* (2017) prepararon emulsiones utilizando un sistema de microfluídica para encapsular *Bacillus subtilis* con un polímero orgánico mPEG-PDLLA (polietilenglicol-b-poli(ácidoL-láctico)) y PVA (alcohol polivinílico). La observación microscópica evidenció rasgos similares a los observados en este trabajo de tesis (anillo definido alrededor de la emulsión y los microorganismos dispersos en la fase acuosa). Eun *et al.* (2015) encapsularon bacterias en micropartículas de agarosa por microfluidica y lograron visualizar los microorganismos dentro de las emulsiones.

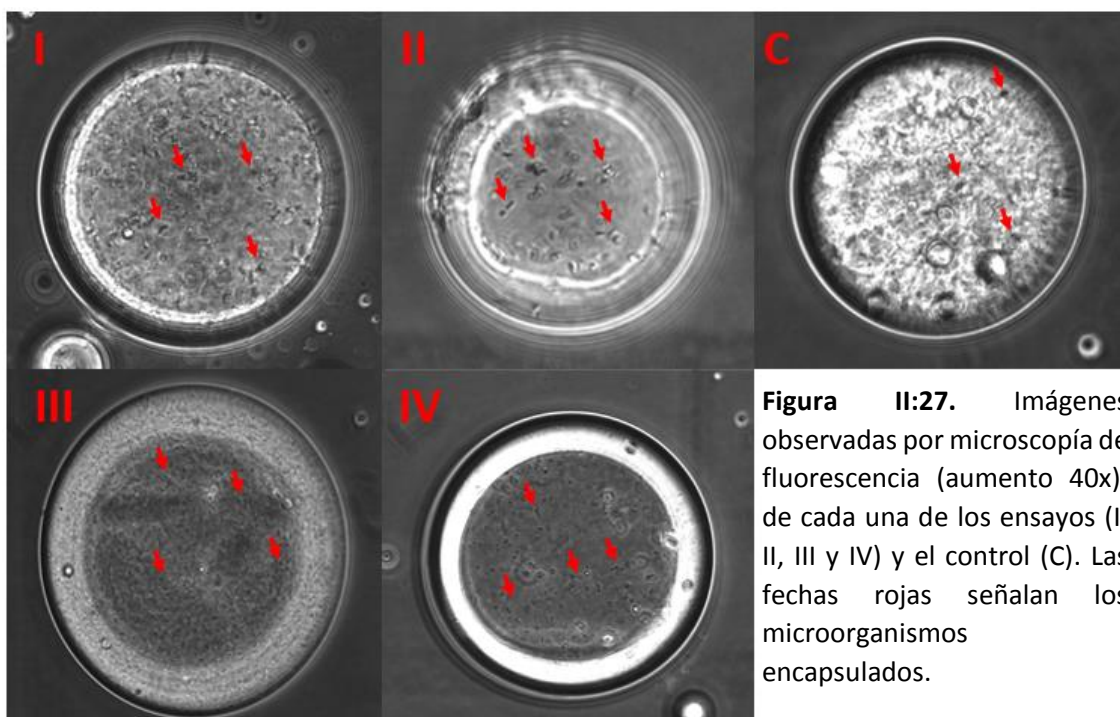


Figura II.27. Imágenes observadas por microscopía de fluorescencia (aumento 40x), de cada una de los ensayos (I, II, III y IV) y el control (C). Las fechas rojas señalan los microorganismos encapsulados.

En las **Figuras II.28, II.29, II.30, II.31 y II.32** se muestran las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia para cada uno de los ensayos realizados (I, II, III y IV) y para el control sin polímero. El grupo de imágenes designados con la letra A y B corresponden a las observaciones al microscopio de las emulsiones, donde A son las emulsiones frescas y B las emulsiones liofilizadas. Por su parte, las imágenes designadas con la letra C, corresponden a las emulsiones observadas con emisión de fluorescencia. Al igual que las imágenes observadas en la **Figura II.27**, se observaron emulsiones en todos los casos (ensayos y control), las cuales mantuvieron su forma esférica luego de la liofilización (**Figuras II.28, II.29, II.30, II.31 y II.32 B**). En el conjunto de imágenes del grupo C, se puede observar las emulsiones marcadas con 6-carboxy-fluoresceína. En todos los casos (ensayos I a IV y control), se observaron las emulsiones marcadas (color verde) sobre el fondo negro, corroborando, por un lado su correcta formación y por otro, que la fase dispersa quedó encapsulada en el interior de las gotas formadas. Otros autores obtuvieron resultados similares, como Vinner *et al.* (2017) que encapsuló fagos marcados con carboxy-fluoresceína dentro de cápsulas formadas por alginato y el polímero Eudragit^R S100.

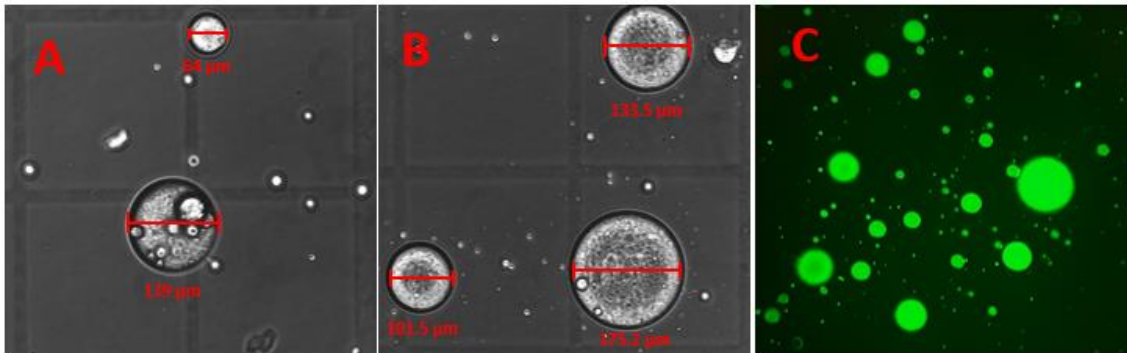


Figura II.28. Emulsiones W/O del control, obtenidas por microscopía de fluorescencia. **A.** Emulsiones frescas; **B.** Emulsiones liofilizadas; **C.** Emulsiones frescas con fluorescencia. Aumento de 20x

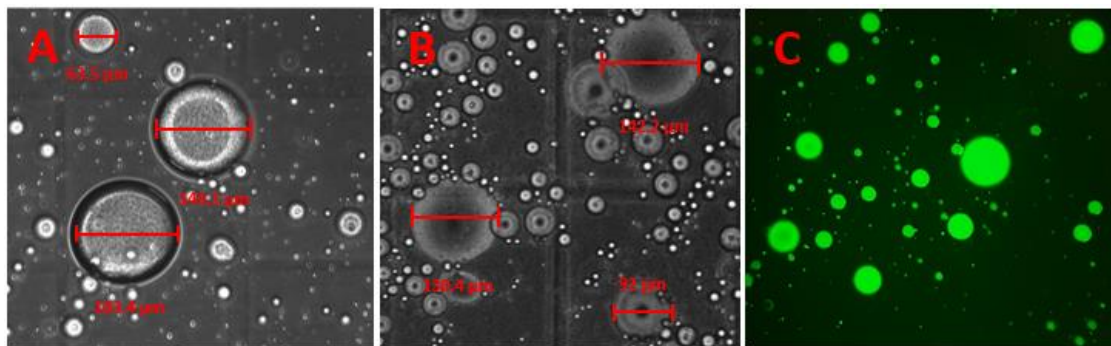


Figura II.29. Emulsiones W/O de la prueba I obtenidas por microscopía de fluorescencia. **A.** Emulsiones frescas; **B.** Emulsiones liofilizadas; **C.** Emulsiones frescas con fluorescencia. Aumento de 20x.

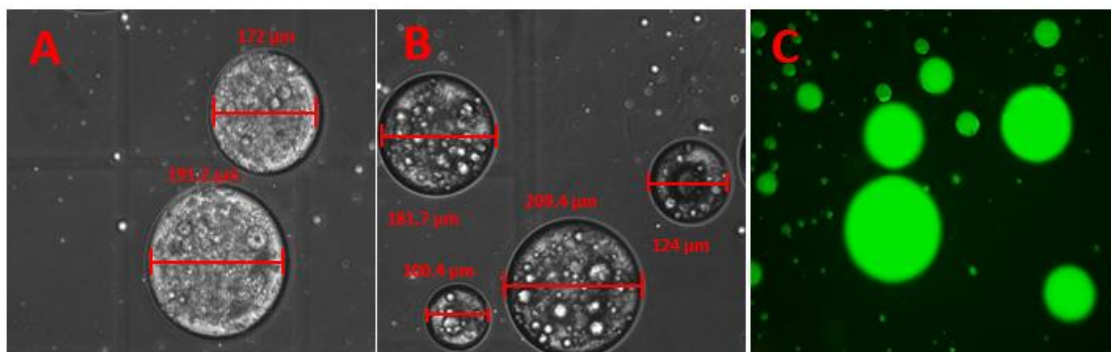


Figura II.30. Emulsiones W/O de la prueba II obtenidas por microscopía de fluorescencia. **A.** Emulsiones frescas; **B.** Emulsiones liofilizadas; **C.** Emulsiones frescas con fluorescencia. Aumento de 20x.

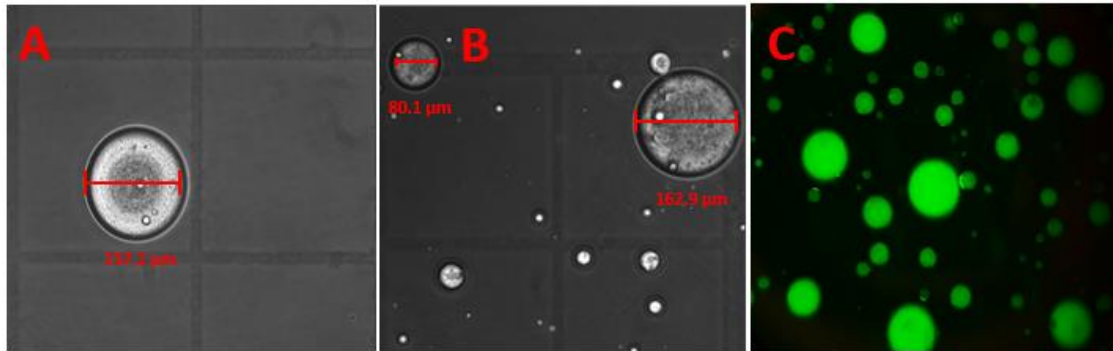


Figura II.31. Emulsiones W/O de la prueba III obtenidas por microscopía de fluorescencia. **A.** Emulsiones frescas; **B.** Emulsiones liofilizadas; **C.** Emulsiones frescas con fluorescencia. Aumento de 20x.

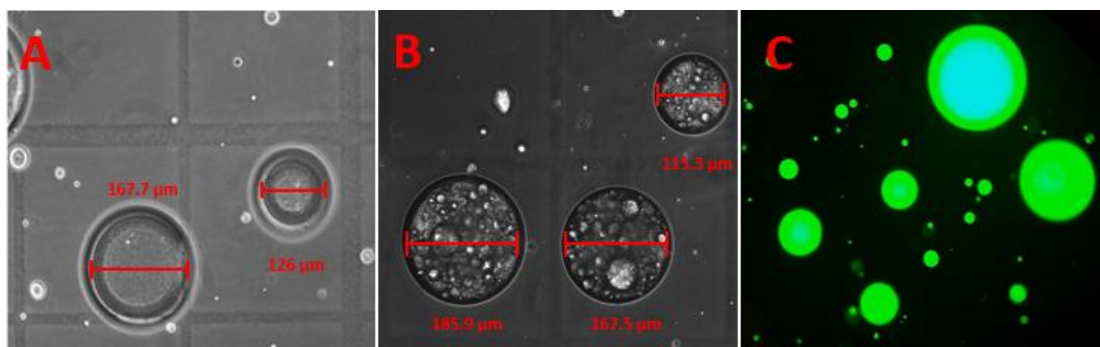


Figura II.32. Emulsiones W/O correspondientes al ensayo IV, obtenidas por microscopía de fluorescencia. **A.** Emulsiones frescas; **B.** Emulsiones liofilizadas; **C.** Emulsiones frescas con fluorescencia. Aumento de 20x.

El grupo de cuadrillas que se observa en las imágenes (**Figuras II.28, II.29, II.30, II.31 y II.32; A, B**) corresponde a las cuadrillas de las Placas Fast Read 102, utilizadas para observar al microscopio (ver materiales y métodos, Capítulo II, Parte 2, sección II.2.2.13). Esto permitió determinar el tamaño de las gotas de las emulsiones que oscilan entre 125 y 200 μm tal como se muestra en la **Figura II.33**. No se observaron diferencias significativas entre las diferentes ensayos formulados (I, II, III, IV) ni con el control. Al momento de comparar los tamaños de las emulsiones frescas (**Figura II.33 barras azules**), con las emulsiones liofilizadas (**Figura II.33 barras rojas**), no se observaron diferencias significativas en ninguno de los casos planteados, tanto para control como para cada uno de los ensayos (I, II, III, IV), presentando poblaciones de emulsiones similares luego de la liofilización.

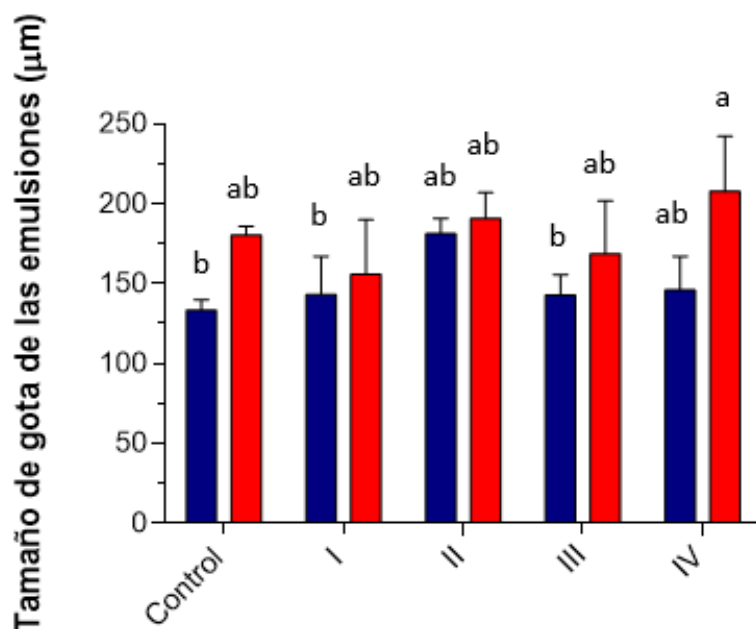


Figura II.33. Tamaño de gota de las emulsiones W/O obtenidas por microfluídica. **Barras azules**, emulsiones frescas; **barras rojas**, emulsiones liofilizadas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

II3.2.3. Digestión gastro-intestinal simulada

Las emulsiones W/O liofilizadas de cada uno de los ensayos (I, II, III y IV), junto al control fueron sometidas a un ensayo de digestión gastrointestinal simulada, lo que permitió analizar la eficiencia de los polímeros utilizados en la liberación controlada de las bacterias. En la **Figura II.34** se muestra la viabilidad bacteriana expresada en log UFC/mL en cada una de las etapas, en donde las barras grises representan los recuentos antes de la digestión, las barras rojas representan la viabilidad luego de someter los encapsulados a digestión gástrica simulada, y por último las barras azules la viabilidad luego de la digestión intestinal. Tanto el control como los ensayos (I, II, III y IV) mostraron un recuento promedio de 11.56 ± 0.34 log UFC/mL antes de someterse al proceso de liofilización (dato no mostrado en la figura). Con este ensayo se buscó evaluar el grado de protección que ejercieron las emulsiones junto con los polímeros así como también estudiar la liberación bacteriana.

Con respecto al recuento inicial, antes de someter las muestras a la digestión, el control liofilizado mostró la mayor viabilidad (9.28 ± 0.06 UFC/mL), presentando diferencias significativas con respecto al resto (ensayos I, II, III y IV). Los ensayos I, II y III

presentaron valores similares, entre 6.23 ± 0.03 y 5.84 ± 0.08 UFC/mL, sin observarse diferencias significativas. Los valores más bajos se observaron en el ensayo IV (5.15 ± 0.21 UFC/mL).

Luego de someter a los encapsulados a condiciones gástricas simuladas, no se observaron diferencias significativas en la viabilidad bacteriana de todos los ensayos con respecto al control. Sin embargo, se observó una disminución significativa de la viabilidad para los ensayos II y III con respecto al ensayo I. Con respecto al control, se observó un descenso significativo de 1.55 ± 0.05 unidades logarítmicas.

Finalmente, luego de la digestión intestinal no se observaron cambios en los ensayos II y III. El ensayo más afectado fue el IV (**Figura II.34**). El ensayo I fue el que presentó los valores de viabilidad más elevados (8.22 ± 0.02 UFC/mL), lo que indica un aumento de aproximadamente 2 unidades logarítmicas con respecto a la viabilidad luego de la digestión gástrica. El control por su parte se vio muy afectado por el proceso de digestión, observándose un descenso de 5.01 ± 0.03 unidades logarítmicas respecto a su recuento inicial.

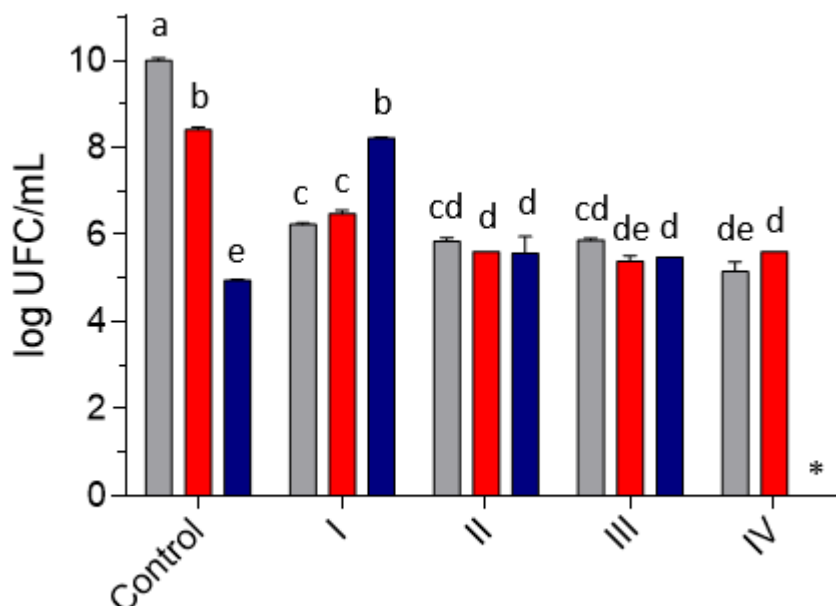


Figura II.34. Viabilidad bacteriana luego de la exponer las emulsiones W/O a una digestión gastro-intestinal simulada. Ensayo control, I, II, III y IV. Las **barras grises** representan la viabilidad antes de la digestión, las **barras rojas** representan la viabilidad luego de la exposición al ambiente gástrico, y las **barras azules** representan la viabilidad luego de la digestión intestinal. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). * Indica que no se observó crecimiento bacteriano.

El ensayo I, formado por emulsiones con *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 y PPP12, presentó el resultado más prometedor. Se observó liberación bacteriana luego de ser sometida a las condiciones intestinales, de 8.22 ± 0.02 UFC/mL (valores adecuados para ejercer su efecto probiótico), con un descenso de 3.34 log UFC/mL con respecto a los recuentos de las emulsiones antes de liofilizar (11.56 ± 0.34 log UFC/mL). Al igual que en la Parte A de este capítulo, el polímero PPP12 fue capaz de soportar las condiciones ácidas del estómago y disolverse en condiciones intestinales, mostrando un efecto protector sobre las bacterias. Este efecto no se observó en los ensayos II y IV (en donde una de sus fases dispersas estaba formada por PPP12) lo que se puede explicar por una posible repulsión electrostática entre el polímero PPP12 y el alginato, que afectó la viabilidad bacteriana. Al exponer las emulsiones de los ensayos II y IV a los pH ácidos de las condiciones gástricas ($\text{pH} \approx 3$), los polímeros PPP12 y alginato se encontraban en valores cercanos a sus pKa (PPP12, $\text{pKa} = 4.95$ y alginato $\text{pKa} = 3.5$) (Cook *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2013), resultando en una mayor relajación de las cadenas de polímeros y una menor repulsión entre ellos, manteniéndose la viabilidad bacteriana en condiciones gástricas (**Figura II.34. Barras rojas**). En condiciones intestinales, con $\text{pH} \approx 8.5$, se presentó una mayor repulsión electrostática entre las cargas negativas de los polímeros, impidiéndole a PPP12 ejercer un efecto protector sobre las bacterias, tal como el observado en el ensayo I. Otros autores informaron casos similares con respecto a las cápsulas expuestas a diferentes pH (Hadzieva *et al.*, 2017). Hadzieva *et al.* (2017), formularon cápsulas con aislados de proteínas de soja y micropartículas de alginato y observaron que a pH de 1.5, los grupos cargados negativamente se neutralizan provocando una menor repulsión. Sin embargo, a pH próximos a 7, la repulsión electrostática aumenta, generando cápsulas más inestables.

Conclusiones

- La técnica microfluídica demostró ser un proceso eficiente para la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 en emulsiones de aceite de okara con PP12 y alginato .
- Las emulsiones con *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 y PPP12 (ensayo I), presentaron el resultado más prometedor. El polímero PPP12 mostró un efecto protector sobre las bacterias frente a la exposición a condiciones gastro-intestinales simuladas, observándose una mayor liberación bacteriana en intestino.

Análisis del Ciclo de Vida del
okara (entero y desengrasado)
fermentado con *Lactobacillus*
plantarum CIDCA 83114

CAPÍTULO III

1.3. Introducción

A la hora de seleccionar los procesos en la elaboración de un producto, el consumo de energía, los materiales y el equipamiento utilizado son temas importantes que no deben ser ignorados. En otras palabras, no tiene sentido aprovechar el okara como medio de cultivo y deshidratación si los procesos involucrados para llegar al producto final no son sustentables. Por esta razón, la optimización de las condiciones de deshidratación de sistemas alimentarios en materia de sustentabilidad es esencial para la valorización exitosa de los subproductos, garantizando su calidad y minimizando costos económicos, ambientales y sociales. Por esta razón, la cuantificación del impacto ambiental de los procesos de conservación, desengrasado, fermentación, deshidratación y almacenamiento en función de las condiciones operativas resulta de suma importancia con vistas a una mejor comprensión de la relación entre producto, proceso y ambiente. Por lo tanto, este abordaje permite evaluar el impacto ambiental del uso de okara (entero y desengrasado) fermentado con *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114.

El impacto ambiental de un producto se inicia con la extracción de las materias primas y termina cuando la vida útil del producto finaliza, convirtiéndose en un residuo que ha de ser tratado adecuadamente. Durante la fabricación, las empresas no solamente deben evaluar el impacto ambiental que tiene su proceso, sino que además, tienen responsabilidad sobre el impacto que ocasiona cada paso del proceso hasta que el producto llega al cliente consumidor (ISO 14040, 2006). Esta cadena, que va “desde el nacimiento hasta la tumba”, es lo que se denomina *ciclo de vida de un producto*.

De acuerdo a la SETAC (Society of Environmental Toxicology And Chemistry), el **análisis del ciclo de vida (ACV)** es un proceso objetivo para evaluar las cargas ambientales asociadas a un producto, proceso o actividad, identificando y cuantificando tanto el uso de materia y energía (entradas) como las emisiones al entorno (salidas), para determinar el impacto de ese uso de recursos y esas emisiones y para evaluar y llevar a la práctica estrategias de mejora ambiental (Piastrellini *et al.*, 2014). El estudio incluye el ciclo completo del producto, proceso o actividad, teniendo en cuenta las etapas de:

- extracción y procesamiento de materias primas,
- diseño y producción,

- empaque, transporte y distribución,
- uso, reutilización y mantenimiento,
- reciclado y disposición final (**Figura III.1**).



Figura III.1. Análisis de Ciclo de Vida de un producto o proceso

Sin embargo, la metodología ACV contiene una componente subjetiva en varios aspectos, en lo que respecta a los límites del sistema, definición de alcances y objetivos, y estimaciones debido a la falta de datos (Georgakellos, 2005; Goedkoop *et al.*, 2008). El ACV es ampliamente utilizado como herramienta para la toma de decisiones en procesos de selección, análisis, diseño y optimización con el fin de identificar tecnologías limpias (Binaghi *et al.*, 2007). Por otro lado, los métodos de optimización y simulación son herramientas valiosas muy aplicadas en ingeniería y diseño de procesos productivos desde hace varias décadas (Francesconi *et al.*, 2007; Oliva *et al.*, 2007). La incorporación de los criterios ambientales en los problemas de optimización, además de los aspectos económicos y técnicos, resulta en una poderosa herramienta computarizada para la toma de decisiones. En este contexto, la integración de técnicas de optimización matemática con la metodología ACV para lograr procesos, productos o actividades sustentables con la menor subjetividad posible, es un desafío ambicioso.

El esquema metodológico definido por la norma internacional ISO (14040 y 14044) y la SETAC, comprende cuatro fases principales (**Figura III.2**):

1. Definición de objetivos y alcances
2. Análisis de inventario
3. Evaluación de Impacto
4. Evaluación de mejora (según SETAC) o Interpretación (según ISO)

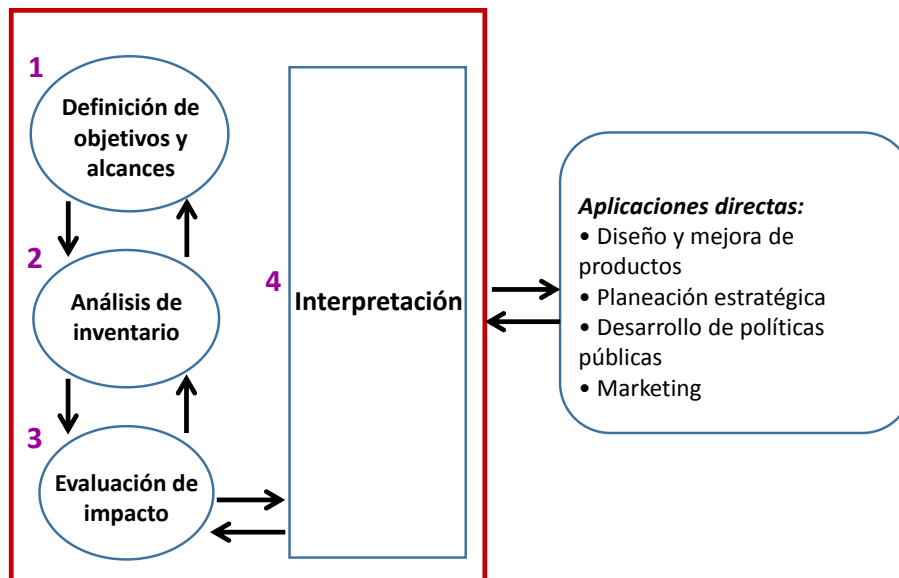


Figura III.2 Etapas del Análisis del Ciclo de vida.

En la etapa inicial de **definición de objetivo y alcance del ACV**, se describe la información general del proyecto. Se definen la problemática, objetivos y alcance del estudio. Es en este paso donde se define la unidad funcional y los flujos de referencia del estudio del ACV. La unidad funcional describe la cantidad del sistema de producción que se está investigando. Esta unidad funcional es la especificación que permite comparar y analizar los productos o servicios en el ACV (Rebitzer *et al.* 2004). En teoría, modelar un estudio de ACV debe abarcar todos los procesos en el ciclo de vida de un servicio o producto. Sin embargo, no es práctico considerar todos los procesos involucrados en un sistema de producción. Por esta razón, los límites del sistema estudiado también tienen que ser definidos.

El **análisis del inventario del ciclo de vida** consiste en la recopilación de los datos y procedimientos de cálculo para cuantificar las entradas y salidas pertinentes de un sistema estudiado de producto y procesos (ISO, 2016). En este paso, se establecen los diagramas de flujo, la recopilación de datos y la asignación de éstos. Se consideran las entradas y salidas del entorno que están correlacionadas con una unidad funcional (Guinée *et al.*, 1993). Este es el paso más laborioso, ya que se consideran todos los flujos en el sistema estudiado con la mayor precisión y exactitud posibles, es decir, se contabilizan desde cientos a millones de servicios, productos, materias primas, procesos, etc. Los grupos de datos principales que deben recolectarse en un inventario son:

- Entrada de energía, entrada de materia primas, entradas auxiliares, otras entradas físicas;
- Productos, co-productos y residuos;
- Emisiones al aire, agua o suelo;
- Otros aspectos ambientales relevantes

La **evaluación de impactos del ciclo de vida** se realiza a partir de los resultados de las etapas precedentes (Priastrellini *et al.*, 2014). Se establecen relaciones causales entre los impactos (emisiones) y los efectos sobre el ambiente, partiendo de una clasificación de los resultados de inventario en distintas categorías de impacto, las cuales se definen en función de los efectos sobre la salud, sobre el ambiente y de la escala en la que actúan (global, regional, local). Se encuentran disponibles diferentes métodos de evaluación de impacto de ciclo de vida y varios de ellos son implementados en *softwares* de ACV (Dreyer *et al.*, 2003). La mayoría de los métodos están basados en categorías de impacto y factores de caracterización, e incluyen los siguientes pasos: clasificación, caracterización, normalización y valoración (Guinée *et al.*, 1993; Huijbregts *et al.*, 2000; Miettinen y Hämmäläinen, 1997).

En la **interpretación del ciclo de vida** se evalúa el análisis realizado con los objetivos y alcances planteados, a fin de establecer conclusiones y recomendaciones.

1.3.1. Herramienta computacional

El *software* SimaPro (Goedkoop *et al.*, 2008) es probablemente el software de ACV más utilizado en la actualidad, y en él se han basado numerosas publicaciones (Guillén-Gosálbez *et al.*, 2008; Calderon *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Gamberini *et al.*, 2010; Pizzol *et al.*, 2011). SimaPro está basado en las normas ISO 14040 con base de datos generales, e incluye varios métodos de evaluación de impacto, tales como Eco-indicator 99, EDIP 97 y 03, EPS 2000, entre otros. Además, la base de datos ECOINVENT (Swiss Center for Life Cycle Inventories) se encuentra integrada en este *software*, permitiendo acceder a una gran variedad de unidades de procesos y a otros inventarios, logrando incorporar múltiples áreas industriales. SimaPro permite analizar los distintos pasos de los métodos y etapas del ciclo de vida, identificando la contribución de cada uno de ellos sobre el impacto total.

Objetivos específicos

- Evaluar el impacto ambiental de la producción de okara (entero y desengrasado) fermentado con *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 y deshidratado.
- Determinar los puntos críticos de los procesos involucrados que tienen mayor contribución en la elaboración del okara (entero y desengrasado) fermentado deshidratado.

2.3. Materiales y Métodos

2.3.1. Alcance del proceso

Se consideró un enfoque del proceso total hasta obtener el okara (entero y desengrasado) fermentado y deshidratado, considerando todos los procesos intermedios. Estos procesos involucran:

- la conservación del okara una vez recibido en el laboratorio (centrifugación, congelación y liofilización),
- el proceso de desengrasado (Soxhlet y secado),
- el proceso de fermentación (preparación del medio, esterilización y fermentación), y
- el proceso de deshidratación y almacenamiento del producto final (congelación-liofilización, secado en *spray* y almacenamiento refrigerado).

Para este propósito, el análisis del ciclo de vida se realizó utilizando datos recopilados a escala de laboratorio, complementados con información de bases de datos.

Como se muestra en la **Figura III.3**, se excluyeron posibles aplicaciones y transporte del producto final de los límites del sistema, así como las actividades relacionadas con la producción del okara utilizado como materia prima, ya que fue donado por la Empresa Soyana S. H. (San Martín, Argentina). También se excluyó de los límites del sistema, la preparación del inóculo bacteriano utilizado para la fermentación, debido a su baja concentración (1% v/v).

La unidad funcional del sistema se definió como 1 kg de okara (entero y desengrasado) fermentado con *L. plantarum* CIDCA 83114 a partir de todos los procesos necesarios para su obtención.

2.3.2. Descripción del proceso completo para la producción de okara fermentado

La obtención de okara fermentado y deshidratado (entero y desengrasado) se divide en 3 procesos para el caso del okara entero y 4 procesos para el caso del okara fermentado (**Figura III.3**). Los etapas involucradas en la obtención del okara fermentado fueron: **proceso de conservación (2.3.2.1)**, **proceso de desengrasado (2.3.2.2)**, **proceso de fermentación (2.3.2.3)** y **proceso de deshidratación y almacenamiento (2.3.2.4)**. Se evaluaron los sistemas involucrados en cada uno de los procesos, desde la preparación

de materias primas (recursos) hasta el producto final a escala de laboratorio. La generación de electricidad promedio en cada uno de los procesos fueron calculados a partir de datos propios del equipo y herramientas del *software* utilizado. La entrada y salida de materiales se han considerado GLOBALES en términos de precisión geográfica en la base de datos.

2.3.2.1. Proceso de conservación. El okara se centrifugó para extraer toda la bebida de soja sobrante de su proceso de elaboración y luego fue descartada. Finalmente el okara se distribuyó en bandejas plásticas que fueron congeladas a -80°C durante 24 horas para luego ser liofilizadas durante 48 horas en un equipo Heto FD4 (Heto Lab Equipment, Dinamarca).

2.3.2.2. Proceso de desengrasado. El okara se desengrasó por medio de un sistema Soxhlet (AOAC, 1990) con una mezcla de éter etílico:éter de petróleo (1:1). Luego el okara desengrasado se dejó secar en estufa a 37°C hasta peso constante.

2.3.2.3. Proceso de fermentación. Se trituraron el okara entero y desengrasado con un equipo Ultra Turrax T25 (IKA, Staufen im Breisgau, Alemania). Luego se prepararon los medios de cultivos con agua destilada al 5% (p/v). Una vez preparados los medios se distribuyeron en botellas para ser esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Finalmente se inoculó con *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 al 1% (v/v) y se incubaron en estufa a 37°C durante 24 horas con agitación constante.

2.3.2.4. Proceso de deshidratación y almacenamiento. El okara (entero y desengrasado) fermentado se sometió a dos procesos de deshidratación:

A. por un lado, el okara fermentado (entero y desengrasado), se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en solución de sacarosa 250 mM. Luego se congeló a -80°C durante 24 horas, se liofilizó durante 48 horas y se almacenó en cámara refrigerada a 4°C ;

B. y por otra parte se deshidrató el okara fermentado (entero y desengrasado) por secado en *spray* (Büchi B290, Flawil, Suiza) y se conservó en cámara refrigerada a 4°C .

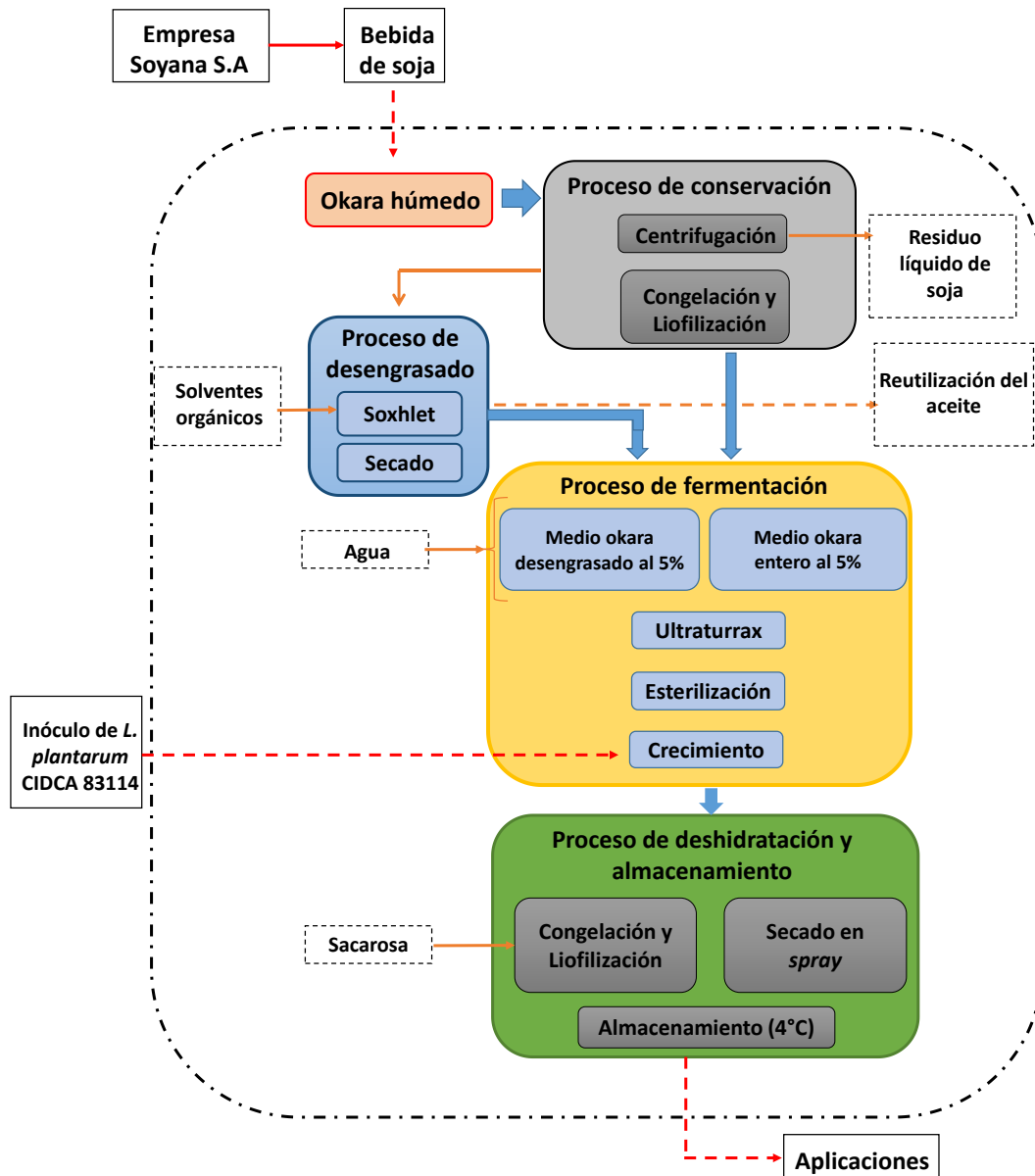


Figura III.3. Límites del sistema y cadena del proceso en estudio correspondiente a la producción de okara (entero y desengrasado) fermentado con *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. La línea discontinua negra indica los límites del sistema.

2.3.3. Recopilación de datos del inventario y asignación del enfoque

Una evaluación ambiental confiable requiere la recopilación de datos del inventario del ciclo de vida. En este estudio, los datos del inventario para el sistema de primer plano (entrada y salidas directas para cada proceso), como los requisitos de electricidad (estimados con datos de potencia y operación de los diferentes equipamientos: centrifugas, liofilizador, secador en *spray*, autoclave, Ultraturrax, estufas, placas calentadoras), así como el uso de productos químicos y agua, fueron datos promedio provenientes de escala de laboratorio (datos primarios). Los datos

primarios para obtención de okara entero y desengrasado, fermentado y deshidratado se muestran en la **Tabla III.1**

Tabla III.1. Resumen de los datos más importantes del inventario por unidad funcional (1 Kg) de okara entero y desengrasado, fermentado con *L. plantarum* CIDCA 83114.

Entradas	Okara entero	Okara desengrasado
Proceso de conservación		
Okara	1 kg	1 kg
Gas refrigerante	0.37 kg	0.37 kg
Electricidad	85 kWh	85 kWh
Proceso de desengrasado		
Okara	-	1 kg
Hexano ¹	-	1 L
Electricidad	-	12 kWh
Proceso de fermentación		
Okara	1 kg	1 kg
Agua destilada	20 L	20 L
Electricidad	16.75 kWh	16.75 kWh
Proceso de deshidratación y almacenamiento		
Okara fermentado	1 kg	1 kg
Sacarosa	0.1 kg	0.1 kg
Gas refrigerante	0.41 kg	0.41 kg
Electricidad (congelación y liofilización)	85 kWh	85 kWh
Electricidad (secado en <i>spray</i>)	20.3 kWh	20.3 kWh
Salidas		
Okara entero fermentado	1 kg	-
Okara desengrasado fermentado	-	1 kg
Residuos del tratamiento		
Bebida de soja	0.2 L	0.2 L

¹El hexano fue usado como equivalente a la mezcla de éter etílico/éter de petróleo (Base de datos Ecoinvent).

Con respecto al sistema de fondo, los datos de inventario correspondientes a la producción de las diferentes entradas a los procesos (electricidad, agua) se tomaron de la base de datos Ecoinvent[®] v3.1 (base de datos Ecoinvent, 2013) perteneciente la *software* SimaPro. La información detallada con respecto a los proceso de fondo se muestran en la **Tabla III.2**.

Tabla III.2. Lista de los procesos más importante de acuerdo a la base de datos Ecoinvent.

Entradas	Proceso/Fuente
Agua destilada	Agua de la canilla, deionizada por el usuario {RoW} producción APOS, S
Soja (Okara) ¹	Grano de soja* {AR**} producción de grano de soja APOS***, S****
Sacarosa	azúcar de remolacha {GLO} mercado de APOS, S
Hexano ²	Hexano {GLO} mercado de APOS, S
Electricidad	Electricidad, voltaje medio {AR} mercado de electricidad, voltaje medio APOS, S
Gas (esterilización)	Calor, central o pequeña escala, gas natural {CH} calor o co-generación de potencia, gas natural, 50kW eléctrico, baja combustión APOS, S
Gas (refrigerante)	Refrigerante R134a {RER} producción APOS, S
Bebida de soja	Bebida de soja {GLO} mercado de APOS, S

¹El grano de soja fue utilizado como equivalente al okara.

²El hexano fue utilizado como equivalente a la mezcla de éter etílico/éter de petróleo.

*Describe y/o brinda información del dato o proceso.

**Hace referencia a la ubicación geográfica (AR = Argentina, GLO = Global)

*** Aporta información acerca del modelo elegido de la base de datos Ecoinvent3. En este caso el modelo de sistema sigue un enfoque atributivo mediante el cual las cargas se asignan proporcionalmente a los procesos específicos del proyecto.

****Sistema del proceso que incluye la infraestructura

2.3.4. Evaluación del impacto

El análisis del ciclo de vida evalúa las cargas ambientales identificando el consumo de recursos y energía, así como las emisiones en diferentes compartimentos ambientales asociados al ciclo de vida del proceso a evaluar, incluyendo la identificación de puntos críticos para implementar mejoras (ISO 14040, 2006).

El programa SimaPro (V8.2.3.0 Pre consultor) se utilizó para la evaluación del ciclo de vida con el método ILCD 2011 (Comisión Europea, 2011), que considera el método de evaluación de impacto de punto medio. Los indicadores de punto medio estudiados (Comisión Europea, 2012) se muestran en la **Tabla III.3.**

Tabla III.3. Indicadores de punto medio y sus abreviaturas

Indicador	Abreviatura
Cambio climático	CC
Agotamiento de la capa de ozono	ODP
Efectos tóxicos en humanos con efectos cancerígenos	HTPce
Efectos tóxicos en humanos sin efectos cancerígenos	HTPnce
Material particulado	PMP
Efectos de la radiación ionizante sobre la salud humana	IRP HH
Efectos de la radiación ionizante sobre los ecosistemas	IRP E
Formación de ozono fotoquímico	POP
Acidificación	AP
Eutrofización terrestre	TEP
Eutrofización de agua dulce	FEP
Eutrofización de agua marina	MEP
Ecotoxicidad de agua dulce	FETP
Uso del suelo	LUP
Disminución de los recursos hídricos	WDP
Disminución de recursos renovables, minerales y fósiles	MFRP

3.3. Resultados y discusión

La contribución de cada etapa del proceso de obtención de okara fermentado (entero y desengrasado), a los impactos ambientales se muestra en la **Figura III.4**, como porcentaje del impacto total.

Para todas las cargas ambientales estudiadas (**Tabla III.3**) las mayores contribuciones se dan en dos procesos: el proceso de conservación (**barras verde oscuro, Figura III.4**) y el proceso de deshidratación y almacenamiento (**barras amarillas, Figura III.4**). Ambos procesos alcanzan una contribución máxima de alrededor del 80 % para cada indicador, salvo para el caso de la disminución de los recursos hídricos (WDP). Este resultado está relacionado con el hecho de que comparten etapas comunes, como son la congelación y la liofilización. A pesar de que los procesos de desengrasado y de fermentación cuentan con diferentes técnicas con gastos energéticos, no son comparables a los requeridos por la congelación y liofilización. Por otra parte, tanto el hexano utilizado como entrada, y el aceite saliente obtenido en la etapa de desengrasado, pueden ser reutilizados, y por lo tanto, no contribuyen al impacto ambiental.

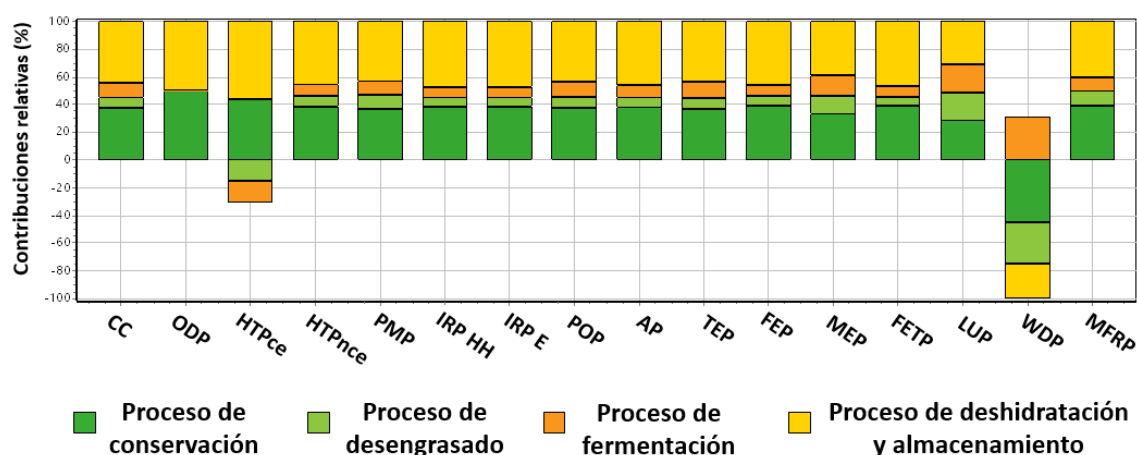


Figura III.4. Distribución de los impactos ambientales generados por los sistemas involucrados en los pasos de obtención de okara entero y desengrasado, fermentado con *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114

En la **Figura III.5** y en la **Tabla III.4** se puede observar las mayores contribuciones en mPt al impacto ambiental de las diferentes entradas (**Tabla III.2**) involucradas en

todos los pasos de obtención de okara fermentado. La mayor contribución al impacto ambiental se debe al gasto eléctrico de todos los equipos utilizados (**barra azul, Figura III.5**). Este impacto duplica al gasto por el consumo de gas (refrigerante), el cual aparece como el segundo con mayor impacto ambiental (**barra roja, Figura III.5**). El mayor gasto eléctrico se debe principalmente a los procesos de congelación y liofilización (**Tabla III.1**), con valores de 85 kWh. Por el contrario, el proceso de secado en *spray* tiene un gasto energético sustancialmente menor (20 kWh) siendo los procesos de deshidratación y almacenamiento, los que más contribuyen a este valor (**Tabla III.4**).

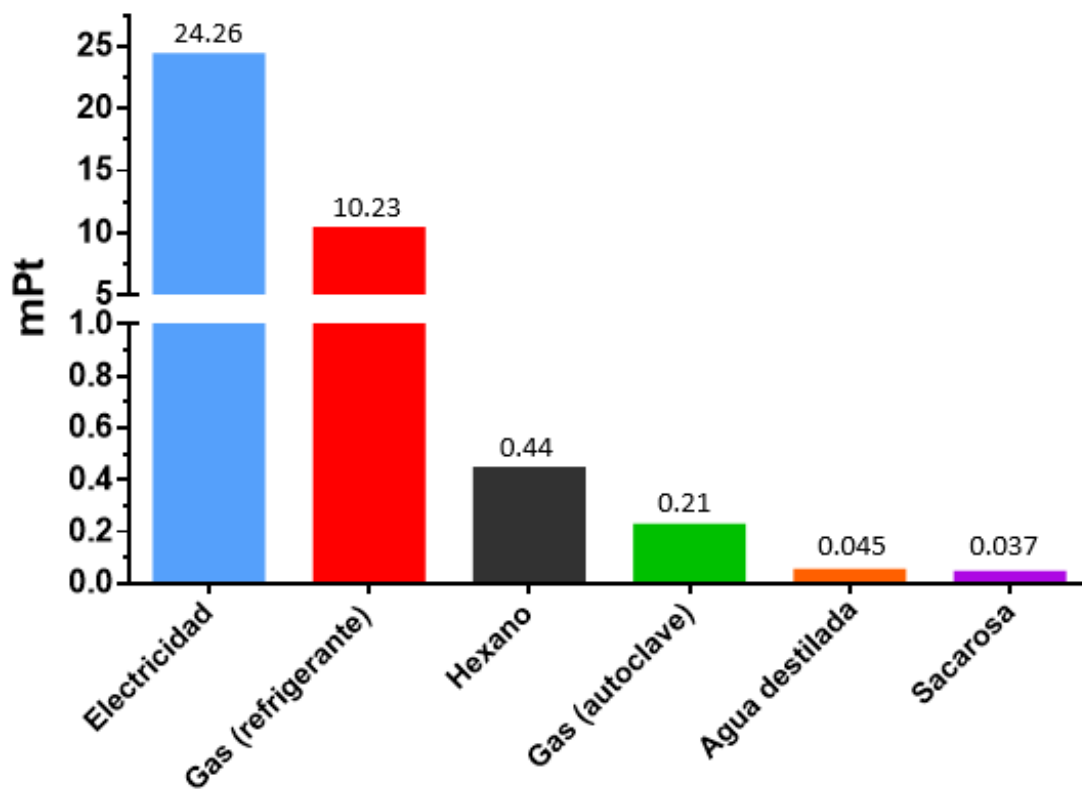


Figura III.5. Contribuciones de las diferentes entradas involucradas en los procesos para la producción de okara entero y desengrasado fermentados al impacto ambiental

Tabla III.4. Contribuciones al impacto ambiental de las diferentes entradas involucradas en los procesos para la producción de okara entero y desengrasado fermentado.

Proceso	Proyecto	Unidad	Total	Proceso de conservación	Proceso de desengrasado	Proceso de fermentación	Deshidratación y almacenamiento
Okara	Ecoinvent3	mPt	0.108	-0.024	-0.024	-0.024	
Sacarosa	Ecoinvent3	mPt	0.037	0	0	0.037	0
Agua destilada	Ecoinvent3	mPt	0.045	0	0	0.045	0
Gas (autoclave)	Ecoinvent3	mPt	0.21	0	0	0.21	0
Hexano	Ecoinvent3	mPt	0.44	0	0.44	0	0
Gas (refrigerante)	Ecoinvent3	mPt	10.23	5.12	0	0	5.12
Electricidad	Ecoinvent3	mPt	24.26	9.41	1.33	1.86	11.66
Todos los procesos		mPt	35	14.51	1.74	2.12	16.76

Otros autores informaron resultados similares respecto al impacto ambiental generado por el proceso de liofilización (Prosapio *et al.*, 2017; Pénicaud *et al.*, 2018). Prosapio *et al.* (2017) utilizaron el *software* SimaPro para hacer un análisis de ciclo de vida del proceso de deshidratación de frutillas. Los autores analizaron un proceso tradicional de secado (liofilización) y una combinación de deshidratación osmótica y la liofilización, demostrando que el proceso de liofilización fue el que presentó mayores contribuciones para todas las categorías de impacto ambientales estudiadas. Por su parte, Pénicaud *et al.* (2018) realizaron un análisis de ciclo de vida para estudiar los puntos críticos de impacto ambiental para la obtención de concentrados de bacterias lácticas, estabilizándolas por procesos de congelación y liofilización. Los autores informaron que los procesos de congelación y liofilización aportaron las mayores contribuciones al impacto ambiental debido a los elevados consumos eléctricos.

Si bien hay varios trabajos que analizan el ciclo de vida de alimentos obtenidos de soja como la bebida de soja (Birgersson *et al.*, 2009; Grant y Hicks, 2018) o a partir de extraer proteína de soja (Berardy *et al.*, 2015; Braun *et al.*, 2016), en ningún caso existe evidencia de un análisis de impacto ambiental realizado en función del aprovechamiento de un subproducto de la soja como es el okara. Estos resultados a escala de laboratorio son de gran importancia ya que brindan información de los puntos críticos relacionados a los procesos que se podrían mejorar o cambiar si se quiere escalar el producto.

Conclusiones

- En la producción del okara (entero y desengrasado) fermentado por *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 los procesos de conservación y deshidratación y almacenamiento mostraron ser los que más contribuyen al impacto ambiental para todos los indicadores salvo en el caso de la disminución de recursos hídricos (WDP)
- El proceso de congelación y liofilización fueron las etapas con mayores gastos energéticos del sistema, dando lugar a las mayores contribuciones al impacto ambiental.

DISCUSIÓN GENERAL

Discusión General

El okara es un subproducto producido en grandes cantidades, cuyo elevado contenido de agua lo hace propenso a la descomposición. Teniendo en cuenta su elevado valor nutricional y efecto prebiótico, encontrar tecnologías alternativas para su tratamiento constituye una excelente opción para agregarle valor como potencial ingrediente a nivel industrial. En este sentido, la fermentación del okara con bacterias lácticas de interés industrial proporciona una alternativa interesante.

Las bacterias lácticas tienen estatus GRAS, es decir son generalmente reconocidas como seguras y la mayor parte de ellas, como *Lactobacillus plantarum*, se encuentran incluidas en la lista de Presunción Cualificada de Seguridad (QPS) de la Unión Europea (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) 2012). Estas características y su acción como probióticos permiten que puedan ser utilizadas en la producción y preservación de alimentos y en aplicaciones biotecnológicas relacionadas con la salud (medicina, industria farmacéutica, nutracéuticos). Sin embargo, para que las bacterias ejerzan su efecto probiótico deben llegar en concentraciones adecuadas a su lugar de destino, luego de ser consumidas. En otras palabras, las bacterias lácticas antes de llegar al intestino, deben superar diferentes factores que afectan su viabilidad como ser el procesamiento y almacenamiento de los alimentos y el pasaje a través del tracto gastrointestinal.

Por lo expuesto anteriormente, este trabajo de tesis se dividió en tres etapas principales: en primer lugar, se aprovechó la disponibilidad del okara para ser utilizado como medio de cultivo y protección de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. Durante el estudio de la composición del okara y la formulación del medio de cultivo se obtuvo un subproducto adicional como el aceite de okara. Teniendo en cuenta la relevancia nutricional de los ácidos grasos insaturados, el aceite de okara fue aprovechado para abordar la segunda etapa de este trabajo de tesis, la microencapsulación. A partir del aceite obtenido se lograron formular emulsiones aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O) para encapsular a *L. plantarum* CIDCA 83114, manteniendo estables las bacterias durante los procesos de deshidratación y almacenamiento y protegiéndolas de ambientes adversos. Por último, se realizó un análisis del ciclo de vida para evaluar el

impacto ambiental del proceso principal de este trabajo que fue la obtención de okara (entero y desengrasado) deshidratado fermentado con *L. plantarum*.

En la primera etapa del trabajo, se estudió la composición centesimal del okara entero y del okara desengrasado, los cuales presentaron una composición similar a los informados por otros autores (Li, B *et al.*, 2012; Vong y Liu, 2016). Tanto en el medio de okara entero como desengrasado, *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 fue capaz de crecer, alcanzando recuentos bacterianos similares a los obtenidos en medio comercial MRS. Los medios de cultivo okara (entero y desengrasado) indujeron cambios importantes en la composición de los ácidos grasos de *L. plantarum*, con aumentos considerables de los ácidos grasos poliinsaturados (C18:2), lo que permitió una mayor estabilización de las bacterias durante los procesos de conservación, en comparación con las bacterias crecidas en MRS.

La composición del medio de deshidratación juega un rol importante en la protección y recuperación bacteriana luego de ser sometidas a los procesos de deshidratación. El proceso de secado en *spray* demostró ser el proceso más adecuado para deshidratar *L. plantarum*, tanto en el okara entero como desengrasado, con pérdidas viabilidad bacteriana significativamente menores que las observadas en MRS. De igual manera, durante el almacenamiento, la cepa de *L. plantarum* crecida en okara (entero y desengrasado) se estabilizó mejor, luego de 90 días de almacenamiento.

Con respecto al proceso de liofilización, el okara entero fue el medio más eficiente en la protección de *L. plantarum* en ausencia de sacarosa (menor pérdida de viabilidad). La adición de sacarosa mejoró la recuperación de microorganismos crecidos en okara desengrasado y en MRS, y no tuvo efecto sobre los crecidos en okara entero. Durante el almacenamiento, las bacterias crecidas en okara entero y desengrasado, mostraron un disminución significativa de la viabilidad bacteriana luego de los 90 días de almacenamiento, observándose una mejora con el agregado de sacarosa.

Como paso final de esta primera etapa, se evaluaron las propiedades antioxidantes del okara fermentado con *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 comparada con los del okara entero y el grano de soja. A pesar de que no se observaron aumentos significativos de la concentraciones de compuestos antioxidantes luego de fermentar el okara, cabe destacar que los compuestos antioxidantes bioaccesibles

presentes en el okara fueron similares a los presentes en los granos de soja, otorgándole un valor agregado a este residuo (debido a la presencia del probiótico).

En una **segunda etapa del trabajo**, se utilizó el aceite de okara, obtenido del proceso de su desengrasado. Se evaluó la composición del aceite de okara y los datos obtenidos fueron similares a los informados por otros autores (Sawada *et al.*, 2014), incluso similares a los informados para el aceite de soja (Canacki, 2005).

En una **primera instancia** se formularon emulsiones aceite en agua (O/W), con el fin de encapsular a *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, utilizando el aceite de okara como fase oleosa y el caseinato de sodio junto con las bacterias como fase acuosa. El aceite de okara se usó en diferentes concentraciones con respecto al caseinato de sodio, que se mantuvo en una concentración constante. Una vez formadas, las emulsiones fueron deshidratadas por secado en *spray* y liofilización.

Las emulsiones deshidratadas por secado en *spray* mostraron mejores características y una mayor estabilidad, tanto de las emulsiones como de los microorganismos. Con respecto a las características de las emulsiones deshidratadas, las cápsulas secadas en *spray* mostraron tamaños significativamente menores que los observados en las muestras liofilizadas, sin observarse diferencias significativas entre las diferentes proporciones de O/W. Este resultado adquiere especial relevancia si se desea incorporar los encapsulados en alimentos. Al momento de evaluar la estabilidad de las emulsiones, las emulsiones secadas en *spray* mostraron tiempos de inducción muy superiores en comparación con las muestras liofilizadas. Estos resultados fueron consistentes con los valores de peróxido, donde las muestras secadas en *spray* presentaron resultados significativamente más bajos. La estabilidad de las emulsiones puede explicarse teniendo en cuenta las elevadas proporciones de ácidos grasos poliinsaturados presentes en el aceite de okara y la morfología de las cápsulas, siendo las secadas en *spray* más uniformes y sin porosidad aparente, lo que dificultaría la entrada de oxígeno.

En un paso posterior se estudió la estabilidad de los microorganismos en las emulsiones, donde una vez más, el proceso de secado en *spray* demostró ser el más adecuado para estabilizar las bacterias durante la deshidratación y almacenamiento. A diferencia de las bacterias liofilizadas, no se observó una disminución significativa de la viabilidad luego de ser secadas en *spray*. En relación al almacenamiento, las bacterias

secas en *spray* no mostraron un descenso de la viabilidad luego de 60 días de almacenamiento, observándose un descenso mínimo transcurridos los 90 días. Por el contrario, las muestras liofilizadas experimentaron un descenso de viabilidad después de 15 días de almacenamiento.

En una **segunda instancia**, se formularon emulsiones agua en aceite (W/O), con un sistema innovador, la microfluidización, que permitió una encapsulación más efectiva de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. Como fase oleosa se utilizó el aceite de okara con lecitina y como fase acuosa, una mezcla de las bacterias, un marcador y un polímero sintético (PPP12) capaz de resistir los ambientes ácidos del estómago y degradarse en el fluido intestinal, ejerciendo un efecto protector durante el pasaje de las bacterias a través del tracto gastrointestinal.

Antes de formular las emulsiones, se evaluó el efecto protector de los polímeros sintéticos de diferentes pesos moleculares, denominados PPP12 y PPP24, por medio de una técnica de encapsulación simple y eficiente como la encapsulación *layer-by-layer*. A fin de evidenciar aún más las propiedades de los polímeros se decidió utilizar una cepa mucho más sensible que *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333. Los polímeros se utilizaron como capas aniónicas (con carga negativa) y como capa positiva se utilizó el quitosano. Por medio de la medida de potencial ζ se logró confirmar el correcto autoensamblaje de las capas sobre la superficie de los microorganismos, mostrando una variación de los valores en forma de *zig-zag* a medida que se agregaron cada una de las capas.

Luego, se evaluó el efecto protector de los polímeros sometidos al proceso liofilización y su posterior pasaje a través del tracto gastro-intestinal simulado, sobre la viabilidad bacteriana. Los encapsulados con dos o tres capas, demostraron ser los más adecuados para proteger las bacterias, no observándose descensos significativos de viabilidad luego de la liofilización y mostrando una mayor protección durante la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas (estabilidad en condiciones gástricas y liberación bacteriana en condiciones intestinales). Por otra parte, el polímero de menor peso molecular (PPP12) fue ligeramente más eficiente que el PPP24, ya que dio lugar a menores descensos de viabilidad durante el proceso de liofilización.

Una vez comprobado el efecto protector de los polímeros, se formularon las emulsiones utilizando el sistema de microfluídica, en donde se decidió utilizar sólo

PPP12. Esta técnica permitió observar en tiempo real la formación de las emulsiones, lo cual representa una gran ventaja, ya que da lugar a un mayor control sobre la generación de las gotas y a una mayor eficiencia de encapsulación de *L. plantarum* CIDCA 83114.

La observación microscópica de bacterias dispersas dentro de las gotas de las emulsiones demostró la eficiencia de la microfluídica en la encapsulación bacteriana. Este dato fue confirmado por microscopía de fluorescencia, al observarse el marcador (carboxy-fluoresceína) dentro de las emulsiones, y comprobarse la encapsulación total del medio acuoso, sin fluorescencia fuera de las gotas.

El flujo de las fases y el tamaño de los canales de los dispositivos microfluídicos (200 μm) fueron factores determinantes en el tamaño de las emulsiones. Las emulsiones sometidas al proceso de liofilización no mostraron diferencias significativas respecto del tamaño de las emulsiones frescas.

Finalmente se evaluó la eficiencia de liberación bacteriana al incorporar el polímero PPP12 a las emulsiones durante el pasaje gastrointestinal. Las bacterias encapsuladas en las emulsiones sin presencia del polímero y liofilizadas, mostraron un descenso significativo de la viabilidad cuando fueron expuestas a condiciones gástricas e intestinales. Las emulsiones que contenían solo el polímero PPP12 fueron las mejor estabilizadas, ya que las bacterias lograron soportar los bajos pH de las condiciones gástricas, y liberarse en condiciones intestinales, donde mostraron un aumento significativo de la viabilidad bacteriana.

Como **tercera y última etapa** de este trabajo de tesis, se evaluó el impacto ambiental de la producción de okara (entero y desengrasado) fermentado con *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 y luego deshidratado, pudiendo determinar los puntos críticos en los procesos que tienen mayores contribuciones. Las mayores contribuciones al impacto ambiental se generaron en los procesos de conservación, y deshidratación y almacenamiento. Dentro de estos procesos, las etapas de congelación y liofilización fueron las responsables de estos resultados. Entre las diferentes entradas que intervienen dentro del sistema, el gasto eléctrico de todos los procesos fue el que mayor contribución tuvo al impacto ambiental, siendo la congelación y liofilización las etapas con mayor gasto energético, muy por encima del gasto observado para el proceso de secado en *spray*.

En resumen, este trabajo de tesis fue de gran relevancia ya que permitió agregar valor al okara, utilizándolo como medio de cultivo y deshidratación de *L. plantarum* CIDCA 83114. De manera adicional, la extracción del aceite de okara permitió la formulación de emulsiones estables que lograron estabilizar *L. plantarum* durante los procesos de deshidratación. Las implicancias de aprovechar el okara como medio de cultivo y deshidratación resultan ventajosas siempre que los procesos involucrados para llegar al producto final tengan un bajo impacto ambiental. En este sentido, el análisis del ciclo de vida a escala de laboratorio del proceso de obtención de okara fermentado y deshidratado fue esencial para determinar los puntos críticos de control. Esto representa un importante punto de partida para el diseño estratégico de productos factibles de llevar a escala piloto o industrial.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Ahn, S. H., Oh, S. C., Choi, I. G., Han, G. S., Jeong, H. S., Kim, K. W., ... and Yang, I.** (2010). Environmentally friendly wood preservatives formulated with enzymatic-hydrolyzed okara, copper and/or boron salts. *Journal of hazardous materials*, 178(1-3), 604-611.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., and Rafiquzzaman, M.** (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Alakhov, V., Pietrzynski, G., Patel, K., Kabanov, A., Bromberg, L., and Hatton, T. A.** (2004). Pluronic block copolymers and Pluronic poly (acrylic acid) microgels in oral delivery of megestrol acetate. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 56(10), 1233-1241.
- Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Silva, J., Carneiro, L., ... and Teixeira, P.** (2009). Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for "Alheira", a fermented meat sausage. *Food Control*, 20(8), 764-770.
- Alves, P., Hugo, A. A., Tymczyszyn, E. E., Ferreira, A. F., Fausto, R., Perez, P. F., ... and Gómez-Zavaglia, A.** (2013). Effect of cholesterol-poly (N, N-dimethylaminoethyl methacrylate) on the properties of stimuli-responsive polymer liposome complexes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 104, 254-261.
- Alzorqi, I., Ketabchi, M. R., Sudheer, S., and Manickam, S.** (2016). Optimization of ultrasound induced emulsification on the formulation of palm-olein based nanoemulsions for the incorporation of antioxidant β -d-glucan polysaccharides. *Ultrasonics sonochemistry*, 31, 71-84.
- Ambawat, S. and Khetarpaul, N.** (2018) Comparative assessment of antioxidant, nutritional and functional properties of soybean and its by-product okara. *Ann Phytomed - An Int J* 7(1):112-118.
- Ananta, E., Volkert, M., and Knorr, D.** (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, 15(4), 399-409.
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., ... and Williams, C. L.** (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition reviews*, 67(4), 188-205.
- Anderson, R. L., and Wolf, W. J.** (1995). Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *The Journal of nutrition*, 125(suppl_3), 581S-588S.

- Anselmo, A. C., McHugh, K. J., Webster, J., Langer, R., and Jaklenec, A.** (2016). Layer-by-layer encapsulation of probiotics for delivery to the microbiome. *Advanced Materials*, 28(43), 9486-9490.
- Aquilina, G., Bach, A., Bampidis, V., Bastos, M.L., Flachowsky, G., Gralak, M.A. and Westendorf, J.** (2013) Scientific opinion on the safety and efficacy of probiotic LACTINA (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Streptococcus thermophilus* and *Enterococcus faecium*) for chickens for fattening and piglets. *EFSA Journal*, 11, 3170–3183.
- Ariga, K., Ji, Q., and Hill, J. P.** (2010). Enzyme-encapsulated layer-by-layer assemblies: current status and challenges toward ultimate nanodevices. In *Modern Techniques for Nano-and Microreactors/-Reactions* (pp. 51-87). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC)** (1980) *Official methods of analysis* (13th ed). Washington, DC, USA: AOAC International. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1995). Washington, DC, USA (16th ed).
- Association of Official Analytical Chemists [AOAC]** (1980). *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists, 13th Edn.* Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Association of Official Analytical Chemists. [AOAC]** (1990). *Official Methods of Analysis: Changes in Official Methods of Analysis Made at the Annual Meeting. Supplement* (Vol. 15). Association of Official Analytical Chemists.
- Association of Official Analytical Chemists [AOAC]** (1995). *Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemists, 2 Vol. 16th Edn.* Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Bae, E.K. and Lee, S.J.** (2008) Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation*, 25, 549–560.
- Bagaria, H. G., and Wong, M. S.** (2011). Polyamine–salt aggregate assembly of capsules as responsive drug delivery vehicles. *Journal of Materials Chemistry*, 21(26), 9454-9466.
- Bai, L. and McClements, D.J.** (2016) Extending emulsion functionality: Post-homogenization modification of droplet properties. *PRO*, 4, 17–35.
- Barbosa-Canovas, G. V., Vega-Mercado, H.** (1996) Dehydration of foods. New York: Chapman and Hall.
- Barlow, J., Gozzi, K., Kelley, C. P., Geilich, B. M., Webster, T. J., Chai, Y., ... and van de Ven, A. L.** (2017). High throughput microencapsulation of *Bacillus subtilis* in semi-permeable biodegradable polymersomes for selenium remediation. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(1), 455-464.

- Barreiro-Iglesias, R., Bromberg, L., Temchenko, M., Hatton, T. A., Alvarez-Lorenzo, C., and Concheiro, A.** (2005). Pluronic-g-poly (acrylic acid) copolymers as novel excipients for site specific, sustained release tablets. *European journal of pharmaceutical sciences*, 26(5), 374-385.
- Bazban-Shotorbani, S., Dashtimoghadam, E., Karkhaneh, A., Hasani-Sadrabadi, M. M., and Jacob, K. I.** (2016). Microfluidic directed synthesis of alginate nanogels with tunable pore size for efficient protein delivery. *Langmuir*, 32(19), 4996-5003.
- Becker, A. L., Johnston, A. P., and Caruso, F.** (2010). Layer-by-layer-assembled capsules and films for therapeutic delivery. *Small*, 6(17).
- Behall, K. M., Scholfield, D. J., and Hallfrisch, J. G.** (2006). Barley β -glucan reduces plasma glucose and insulin responses compared with resistant starch in men. *Nutrition research*, 26(12), 644-650.
- Bengoechea Ruiz C** (2006). Estudio reológico de emulsiones alimentarias estabilizadas con proteínas vegetales. Tesis Doctoral, Facultad de Química, Sevilla.
- Berardy, A., Costello, C., and Seager, T.** (2015). Life cycle assessment of soy protein isolate. In *Proceedings of the International Symposium on Sustainable Systems and Technologies, Dearborn, MI, USA* (pp. 18-20).
- Bermúdez-Soto, M.J., Tomás-Barberán, F.A. and García-Conesa, M.T.** (2007) Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102(3):865-874.
- Binaghi, L., Del Borghi, M., and Gallo, M.** (2007). The application of the environmental product declaration to waste disposal in a sanitary landfill-four case studies (10 pp). *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 12(1), 40-49.
- Binsi, P.K., Nayak, N., Sarkar, P.C., Jeyakumari, A., Ashraf, P.M., Ninan, G. and Ravishankar, C.N.** (2017) Structural and oxidative stabilization of spray dried fish oil microencapsulates with gum arabic and sage polyphenols: Characterization and release kinetics. *Food chemistry*, 219, 158–168.
- Birgersson, S., Karlsson, B. S., & Söderlund, L.** (2009). Soy Milk—an attributional life cycle assessment examining the potential environmental impact of soy milk. *Stockholm, Sweden: Stockholm University*.
- Borges, S., Barbosa, J., Silva, J., Gomes, A. M., Pintado, M., Silva, C. L., ... and Teixeira, P.** (2016). A feasibility study of *Lactobacillus plantarum* in fruit powders after processing and storage. *International journal of food science & technology*, 51(2), 381-388.
- Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R., and Cesàro, A.** (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food chemistry*, 122(2), 416-423.

- Bouayed, J., Hoffmann, L. and Bohn, T.** (2011) Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1):14-21.
- Bourdichon, F., Boyaval, P., Casaregola, S., Dupont, J., Farrokh, C., Frisvad, J., . . . and Laulund, S.** (2012). The 2012 inventory of microbial species with technological beneficial role.
- Braun, M., Muñoz, I., Schmidt, J. H., and Thrane, M.** (2016). Sustainability of soy protein from life cycle assessment. *The FASEB Journal*, 30(1_supplement), 894-5.
- Broeckx, G., Vandenhevel, D., Claes, I. J., Lebeer, S., and Kiekens, F.** (2016). Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1-2), 303-318.
- Buchi Application Note Bulletin Número: 248/207** (2017). Microencapsulation of flavors and fragrances by spray drying. Disponible en: https://static1.buchi.com/sites/default/files/AN_248_2017_flavor_and_fragrance.pdf
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., and Scher, J.** (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of food engineering*, 104(4), 467-483.
- Bustos, P., and Bórquez, R.** (2013). Influence of osmotic stress and encapsulating materials on the stability of autochthonous *Lactobacillus plantarum* after spray drying. *Drying technology*, 31(1), 57-66.
- Cabané, P., Alvo, A., Neira-Carrillo, A., Caviedes, P., and Gac, P.** (2011). Microencapsulación de células y tejido para terapia celular. *Revista chilena de cirugía*, 63(1), 110-113.
- Calderón, L. A., Iglesias, L., Laca, A., Herrero, M., and Díaz, M.** (2010). The utility of Life Cycle Assessment in the ready meal food industry. *Resources, conservation and recycling*, 54(12), 1196-1207.
- Calviño, P. A., and Monzón, J. P.** (2009). Farming systems of Argentina: Yield constraints and risk management. Crop physiology: Applications for genetic improvement and agronomy. *San Diego, California., Elsevier Academic Press*, 51, 70.
- Campbell, I., Norton, I. and Morley, W.** (1996). Factors controlling the phase inversion of oilin- water emulsions. *Neth Milk Dairy J*, 50:167-182
- Canakci, M.** (2005). Performance and emissions characteristics of biodiesel from soybean oil. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part D: Journal of Automobile Engineering*, 219(7), 915-922.

- Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M. T., López, P., and Spano, G.** (2012a). Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(6), 1383-1394.
- Carr, F. J., Chill, D., and Maida, N.** (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28(4), 281-370.
- Carocho, M., and Ferreira, I. C.** (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25.
- Caruso, F., Caruso, R. A., and Möhwald, H.** (1998). Nanoengineering of inorganic and hybrid hollow spheres by colloidal templating. *Science*, 282(5391), 1111-1114.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., and Gibbs, P.** (2002). Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnology Letters*, 24(19), 1587-1591.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., and Gibbs, P.** (2003). Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology*, 94(6), 947-52.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., and Gibbs, P.** (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14(10), 835-847.
- Cassani, L., Gomez-Zavaglia, A., and Simal-Gandara, J.** (2019). Technological strategies ensuring the safe arrival of beneficial microorganisms to the gut: from food processing and storage to their passage through the gastrointestinal tract. *Food Research International*, 18852.
- Castro, J. M., Tornadijo, M. E., Fresno, J. M., and Sandoval, H.** (2015). Biocheese: a food probiotic carrier. *BioMed research international*, 2015.
- Centes, J. F. L., Zimeri, L. A. M., Navarro, M. A., and Posadas, Á. A.** (2007). Obtención Y Uso De Quitosano Para Tratamientos Dérmicos A Partir De Exoesqueleto De Camarón. *Boletín Electrónico. Guatemala*.
- Champagne, C. P., and Fustier, P.** (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 184-190.
- Champagne C.P. and 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
- Chan, W. M., and Ma, C. Y.** (1999). Acid modification of proteins from soymilk residue (okara). *Food Research International*, 32(2), 119-127.

- Charalampopoulos, D., Pandiella, S. S., and Webb, C.** (2002). Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 851-859.
- Charalampopoulos, D., and Rastall, R. A.** (2012). Prebiotics in foods. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 187-191.
- Charnchai, P., Jantama, S. S., Prasitpuriprecha, C., Kanchanatawee, S., and Jantama, K.** (2016). Effects of the food manufacturing chain on the viability and functionality of *Bifidobacterium animalis* through simulated gastrointestinal conditions. *PLoS One*, 11(6).
- Chávarri, M., Marañón, I., and Villarán, M. C.** (2012). Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. In *Probiotics*. IntechOpen.
- Chávez, B. E., and Ledebøer, A. M.** (2007). Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying technology*, 25(7-8), 1193-1201.
- Chen, C., Habert, G., Bouzidi, Y., Jullien, A., and Ventura, A.** (2010). LCA allocation procedure used as an incitative method for waste recycling: An application to mineral additions in concrete. *Resources, Conservation and Recycling*, 54(12), 1231-1240.
- Chen, C., Zhou, F., Rena, J., Aia, L., Donga, Y. and Wua, Z.** (2014) Cloning, expression and functional validation of a β -fructofuranosidase from *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry*, 49, 758–767.
- Chen, K. N., Kuo, C. Y., Shiu, J. S., and Chen, M. J.** (2011). Process optimization for a novel kefir candy with high probiotic viability. *Journal of Food Process Engineering*, 34(2), 427-443.
- Chen, M. J., and Chen, K. N.** (2007). Applications of probiotic encapsulation in dairy products. *Encapsulation and controlled release technologies in food systems*, 83-112.
- Choi, J., and Rubner, M. F.** (2005). Influence of the degree of ionization on weak polyelectrolyte multilayer assembly. *Macromolecules*, 38(1), 116-124.
- Choo, E. S. G., Yu, B., and Xue, J.** (2011). Synthesis of poly (acrylic acid)(PAA) modified Pluronic P123 copolymers for pH-stimulated release of doxorubicin. *Journal of colloid and interface science*, 358(2), 462-470.
- Chu, L. Y., Utada, A. S., Shah, R. K., Kim, J. W., and Weitz, D. A.** (2007). Controllable monodisperse multiple emulsions. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(47), 8970-8974.
- Chung, K., Crane, M. M., and Lu, H.** (2008). Automated on-chip rapid microscopy, phenotyping and sorting of *C. elegans*. *Nature methods*, 5(7), 637.

- Coman, M. M., Cecchini, C., Verdenelli, M. C., Silvi, S., Orpianesi, C., and Cresci, A.** (2012). Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. *International Journal of Food Microbiology*, 157(3), 346-352.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., and Khutoryanskiy, V. V.** (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of controlled release*, 162(1), 56-67.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Khutoryanskiy, V. V., and Charalampopoulos, D.** (2013). Layer-by-layer coating of alginate matrices with chitosan–alginate for the improved survival and targeted delivery of probiotic bacteria after oral administration. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(1), 52-60.
- Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and Stanton, C.** (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1024-39.
- Cortez, M. L.** (2011). *Materiales compuestos para la construcción de sensores* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., and Rúperez, P.** (2015). Prebiotics: concept, properties and beneficial effects. *Nutricion hospitalaria*, 31, 99-118.
- Coulibaly, I., Amenan, A. Y., Lognay, G., Fauconnier, M. L., and Thonart, P.** (2008). Survival of freeze-dried *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* related to their cellular fatty acids composition during storage. *Applied biochemistry and biotechnology*, 157(1), 70-84.
- Coulibaly, I., Dubois-Dauphin, R., Destain, J., Fauconnier, M. L., Lognay, G., and Thonart, P.** (2010). The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. *International journal of microbiology*, 2010.
- Coupland, J. N.** (2006) Beyond hard spheres: the functional role of lipids in food emulsions. In *Handbook of Functional Lipids* (pp. 170-183), CRC Press.
- Courtois, J.** (2009). Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology*, 12(3), 261-273.
- Das, S. K., Nakka, S. R., Rajabalaya, R., Mukhopadhyay, H. K., Halder, T., Palanisamy, M., ... and Nanda, A.** (2011). Microencapsulation techniques and its practice. *International Journal Pharmacy Science, Tech*, 6(2), 1.
- de Castro Santana, R., Kawazoe Sato, A. C., and Lopes da Cunha, R.** (2012) Emulsions stabilized by heattreated collagen fibers. *Food Hydrocolloids*, 26(1) 73-81.

- de la Paz, N., Fernández, M., López, O. D., Nogueira, A., García, C. M., Pérez, D., ... and Díaz, D. (2012).** Optimización del proceso de obtención de quitosano derivada de quitina de langosta. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 13(3), 103-116.
- de Man, J. O., Rogosa, M., and Sharpe, M.E. (1960)** A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *Journal of applied Bacteriology*, 23, 130–135.
- de Souza Simões, L., Madalena, D. A., Pinheiro, A. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., and Ramos, O. L. (2017).** Micro-and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. *Advances in Colloid and Interface Science*, 243, 23-45.
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., and Sikkema, J. (2010).** Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International dairy journal*, 20(4), 292-302.
- Decher, G., and Schmitt, J. (1992).** Fine-tuning of the film thickness of ultrathin multilayer films composed of consecutively alternating layers of anionic and cationic polyelectrolytes. In *Trends in Colloid and Interface Science VI* (pp. 160-164). Steinkopff.
- Deepika, G., Rastall, R. A., and Charalampopoulos, D. (2011).** Effect of food models and low-temperature storage on the adhesion of *Lactobacillus rhamnosus* GG to Caco-2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(16), 8661-8666.
- Del Piano, M., Morelli, L., Strozzi, G. P., Allesina, S., Barba, M., Deidda, F., ... and Sartori, M. (2006).** Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, 38, S248-S255.
- Desai, K. G. H., and Jin Park, H. (2005).** Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology*, 23(7), 1361-1394.
- Desmond, C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Collins, K., and Ross, R. P. (2002).** Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 183-190.
- Dickinson, E. (1989).** Surface and emulsifying properties of caseins. *Journal of dairy research*, 56(3), 471-477.
- Dickinson, E. (2010).** Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), 130-140.
- Dodoo, C. C., Wang, J., Basit, A. W., Stapleton, P., and Gaisford, S. (2017).** Targeted delivery of probiotics to enhance gastrointestinal stability and intestinal colonisation. *International journal of pharmaceuticals*, 530(1-2), 224-229.
- Dreyer, L. C., Niemann, A. L., and Hauschild, M. Z. (2003).** Comparison of three different LCIA methods: EDIP97, CML2001 and Eco-indicator 99. *The international journal of life cycle assessment*, 8(4), 191-200.

- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., ... and Kiely, B.** (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 386s-392s.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).** (2013). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*, 11(11), 3449.
- El Hage, R., Hernandez-Sanabria, E., and Van de Wiele, T.** (2017). Emerging trends in “smart probiotics”: functional consideration for the development of novel health and industrial applications. *Frontiers in microbiology*, 8, 1889.
- Elizarova, I. S., and Luckham, P. F.** (2017). Layer-by-layer encapsulated nano-emulsion of ionic liquid loaded with functional material for extraction of Cd²⁺ ions from aqueous solutions. *Journal of colloid and interface science*, 491, 286-293.
- Espinosa-Martos, I., and Rupérez, P.** (2009). Indigestible fraction of okara from soybean: composition, physicochemical properties and in vitro fermentability by pure cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. *European Food Research and Technology*, 228(5), 685-693.
- Etchepare, M. D. A., Barin, J. S., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Wagner, R., Fries, L. L. M., and Menezes, C. R. D.** (2015). Microencapsulation of probiotics using sodium alginate. *Ciência Rural*, 45(7), 1319-1326.
- Eun, Y. J., Utada, A. S., Copeland, M. F., Takeuchi, S., and Weibel, D. B.** (2011). Encapsulating bacteria in agarose microparticles using microfluidics for high-throughput cell analysis and isolation. *ACS chemical biology*, 6(3), 260-266.
- Evans, M., Ratcliffe, I. and Williams, P.A.** (2013) Emulsion stabilisation using polysaccharide–protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18, 272–282.
- FAO** (2010) Fats and fatty acids in human nutrition report of an expert consultation. FAO Food and Nutrition Paper. 91Rome: FAO (Final report).
- FAO/OMS.** (2002). WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. *London*. https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., and Ouwehand, A. C.** (2019). The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms*, 7(3), 83.
- Fijan, S.** (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International journal of environmental research and public health*, 11(5), 4745-4767.

- Firpo, G., Angeli, E., Repetto, L., and Valbusa, U.** (2015). Permeability thickness dependence of polydimethylsiloxane (PDMS) membranes. *Journal of Membrane Science*, 481, 1-8.
- Fonseca, F., Béal, C., and Corrieu, G.** (2001). Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology*, 43(3), 189-98.
- Francesconi, J. A., Mussati, M. C., and Aguirre, P. A.** (2007). Analysis of design variables for water-gas-shift reactors by model-based optimization. *Journal of Power Sources*, 173(1), 467-477.
- Freitas, S.C., Alves da Silva, G., Perrone, D., Vericimo, A.M., dos Santos Baião, D., Pereira, P.R., Paschoalin, V.M.F. and del Aguila, E.M.** (2018) Recovery of antimicrobials and bioaccessible isoflavones and phenolics from soybean (*Glycine max*) meal by aqueous extraction. *Molecules* 24(1):74.
- Frias, J., Martinez-Villaluenga, C., and Peñas, E.** (2016). Fermented foods in health promotion and disease prevention: An overview. *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (pp. 3-20). London: Elsevier.
- Friedman, M., and Brandon, D. L.** (2001). Nutritional and health benefits of soy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1069-1086.
- Gaggia, F., Di Gioia, D., Baffoni, L., and Biavati, B.** (2011). The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. *Trends in Food Science & Technology*, 22, S58-S66.
- Gallardo, G., Guida, L., Martinez, V., López, M. C., Bernhardt, D., Blasco, R., ... and Hermida, L. G.** (2013). Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. *Food Research International*, 52(2), 473-482.
- Gamberini, R., Gebennini, E., Manzini, R., and Ziveri, A.** (2010). On the integration of planning and environmental impact assessment for a WEEE transportation network—A case study. *Resources, Conservation and Recycling*, 54(11), 937-951.
- Gañán-Calvo, A. M.** (1998). Generation of steady liquid microthreads and micron-sized monodisperse sprays in gas streams. *Physical review letters*, 80(2), 285.
- Gao, J., Si, C., and He, Y.** (2013). Application of soybean residue (okara) as a low-cost adsorbent for reactive dye removal from aqueous solution. *Desalination and Water Treatment*, 53(8), 2266-2277.
- Garcia, A. L., Otto, B., Reich, S. C., Weickert, M. O., Steiniger, J., Machowetz, A., ... and Meuser, F.** (2007). Arabinoxylan consumption decreases postprandial serum glucose, serum insulin and plasma total ghrelin response in subjects with impaired glucose tolerance. *European journal of clinical nutrition*, 61(3), 334-341.

- Gardiner, G. E., O'Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., and 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.
- Garrote, G.L., Abraham, A.G. and De Antoni, G.L.** (2001) Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68, 639–652.
- Garti, N.** (1999). What can nature offer from an emulsifier point of view: trends and progress?. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152(1-2), 125-146.
- Gautier, J., Passot, S., Pénicaud, C., Guillemin, H., Cenard, S., Lieben, P., and Fonseca, F.** (2013). A low membrane lipid phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* CFL1. *Journal of dairy science*, 96(9), 5591-5602.
- Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., and Marchioni, E.** (2009). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International journal of food microbiology*, 129(1), 103-105.
- Genovese, M. I., and Lajolo, F. M.** (2002). Isoflavones in soy-based foods consumed in Brazil: levels, distribution, and estimated intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5987-5993.
- Georgakellos, D. A.** (2005). Evaluation of life cycle inventory results using critical volume aggregation and polygon-based interpretation. *Journal of Cleaner Production*, 13(6), 567-582.
- Gerez, C. L., Torino, M. I., Rollán, G., and de Valdez, G. F.** (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food control*, 20(2), 144-148.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., . . . and Cani, P. D.** (2017). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(8), 491.
- Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., . . . and Loh, G.** (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin of Functional Foods*, 7(1), 1-19.
- Giraffa, G., Chanishvili, N., and Widyastuti, Y.** (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in microbiology*, 161(6), 480-487.
- Goedkoop, M., De Schryver, A., Oele, M., Durksz, S., and de Roest, D.** (2008). Introduction to LCA with SimaPro 7. *PRé Consultants, The Netherlands*.

- Gomand, F., Borges, F., Burgain, J., Guerin, J., Revol-Junelles, A. M., and Gaiani, C.** (2019). Food matrix design for effective lactic acid bacteria delivery. *Annual review of food science and technology*, 10, 285-310.
- Golowczyc, M. E.** (2008). *Caracterización taxonómica, probiótica y tecnológica de lactobacilos aislados de kéfir* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Golowczyc, M.A., Silva, J., Teixeira, P., De Antoni, G.L. and Abraham, A.G.** (2011b) Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. *International Journal of Food Microbiol.* 144, 556–560.
- Gómez-Zavaglia, A., Abraham, A., Giorgieri, S., and De Antoni, G.** (1999). Application of polyacrylamide gel electrophoresis and capillary gel electrophoresis to the analysis of *Lactobacillus delbrueckii* whole-cell proteins. *Journal of Dairy Science*, 82(5), 870-877.
- Gomez-Zavaglia, A., Disalvo, E.A., and De Antoni, G.L.** (2000) Fatty acid composition and freeze-thaw resistance in lactobacilli. *Journal of Dairy Research.* 67, 241–247.
- Goodarzi, F., and Zendejboudi, S.** (2019). A comprehensive review on emulsions and emulsion stability in chemical and energy industries. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 97(1), 281-309.
- Grant, C. A., and Hicks, A. L.** (2018). Comparative life cycle assessment of milk and plant-based alternatives. *Environmental Engineering Science*, 35(11), 1235-1247.
- Grattepanche, F., and Lacroix, C.** (2013). Production of viable probiotic cells. In *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals* (pp. 321-352). Woodhead Publishing.
- Griffiths, K., Aggarwal, B. B., Singh, R. B., Buttar, H. S., Wilson, D., and De Meester, F.** (2016). Food antioxidants and their anti-inflammatory properties: a potential role in cardiovascular diseases and cancer prevention. *Diseases*, 4(3), 28.
- Groboillot, A. F., Champagne, C. P., Darling, G. D., Poncelet, D., and Neufeld, R. J.** (1993). Membrane formation by interfacial cross-linking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. *Biotechnology and bioengineering*, 42(10), 1157-1163.
- Guerin, J., Burgain, J., Borges, F., Bhandari, B., Desobry, S., Scher, J., and Gaiani, C.** (2017). Use of imaging techniques to identify efficient controlled release systems of *Lactobacillus rhamnosus* GG during in vitro digestion. *Food & function*, 8(4), 1587-1598.
- Guillén-Gosalbez, G., Caballero, J. A., and Jimenez, L.** (2008). Application of life cycle assessment to the structural optimization of process flowsheets. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(3), 777-789.

- Guinée, J. B., Heijungs, R., de Haes, H. A. U., and Huppes, G. (1993).** Quantitative life cycle assessment of products: 2. Classification, valuation and improvement analysis. *Journal of Cleaner Production*, 1(2), 81-91.
- Guiotto, E. N., Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., and Tomás, M. C. (2014).** Effect of storage conditions and antioxidants on the oxidative stability of sunflower–chia oil blends. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(5), 767-776.
- Hadzieva, J., Mladenovska, K., Simonoska Crcarevska, M., Glavaš Dodov, M., Dimchevska, S., Geškovski, N., ... and Petreska Ivanovska, T. (2017).** Lactobacillus casei encapsulated in soy protein isolate and alginate microparticles prepared by spray drying. *Food technology and biotechnology*, 55(2), 173-186.
- Hall, S., Cooke, M., Pacek, A. W., Kowalski, A. J., and Rothman, D. (2011).** Scaling up of Silverson rotor–stator mixers. *The Canadian journal of chemical engineering*, 89(5), 1040-1050.
- Halliwell, B. (2001).** Free radicals and other reactive species in disease. *Els*, 1-9.
- Hamman, J. H. (2010).** Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Marine drugs*, 8(4), 1305-1322.
- Hammes, W. P., and Tichaczek, P. S. (1994).** The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 198(3), 193-201.
- Hansen, M. L. R., Clausen, A., Ejsing, C. S., and Risbo, J. (2015a).** Modulation of the Lactobacillus acidophilus La-5 lipidome by different growth conditions. *Microbiology*, 161(10), 1990-1998.
- Hansen, M.L.R.W., Petersen, M.A., Risbo, J., Hümmer, M. and Clausen, A. (2015b)** Implications of modifying membrane fatty acid composition on membrane oxidation, integrity, and storage viability of freeze-dried probiotic, *Lactobacillus acidophilus* La-5. *Biotechnology progress*. Prog. 31, 799–807.
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., and McClements, D. J. (2006).** Influence of pH and ionic strength on formation and stability of emulsions containing oil droplets coated by β -lactoglobulin– alginate interfaces. *Biomacromolecules*, 7(6), 2052-2058.
- Hâti, A. G., Bassett, D. C., Ribe, J. M., Sikorski, P., Weitz, D. A., & Stokke, B. T. (2016).** Versatile, cell and chip friendly method to gel alginate in microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 16(19), 3718-3727.
- Heidebach, T., Först, P., and Kulozik, U. (2010).** Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of food engineering*, 98(3), 309-316.

- Herigstad, B., Hamilton, M., and Heersink, J.** (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of microbiological methods*, 44(2), 121-129.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... and Calder, P. C.** (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 506.
- Hill, T. L.** (1986). *An introduction to statistical thermodynamics*. Courier Corporation.
- Hincha, D.K., Zuther, E. and Heyer, A.G.** (2003) The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, Acta 1612, 172–177.
- Holt, C.** (1982) Inorganic constituents of milk III. The colloidal calcium phosphate of cow's milk. *Journal of Dairy Research*, 49, 29–38.
- Hou, R.C.W., Lin, M Y., Wang, M.M., and Tzen, J.T.** (2003) Increase of viability of entrapped cells of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* in artificial sesame oil emulsion. *Journal of Dairy Science*, 86, 424–428.
- Hsieh, C., and Yang, F. C.** (2004). Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology*, 91(1), 105-109.
- Huerta, A. C., Rincón, M. C., Inciarte, A. C., and López, A.** (2012). Obtención y caracterización de películas de quitosano elaborado a partir de los desechos de la industria cangrejera. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13(3), 77-88.
- Huijbregts, M. A., Thissen, U., Guinée, J. B., Jager, T., Kalf, D., Van de Meent, D., ... and Reijnders, L.** (2000). Priority assessment of toxic substances in life cycle assessment. Part I: Calculation of toxicity potentials for 181 substances with the nested multi-media fate, exposure and effects model USES–LCA. *Chemosphere*, 41(4), 541-573.
- Hussain, R., Gaiani, C., Aberkane, L., Ghanbaja, J., and Scher, J.** (2011). Multiscale characterization of casein micelles under NaCl range conditions. *Food biophysics*, 6(4), 503-511.
- IUPAC** (1992) Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. In P.C.H.A (Ed.). International Union of Pure and Applied Chemistry. England, Oxford: Oxford, Blackwell Scientific Publications Inc.
- Ixtaina, V.Y., Julio, L.M., Wagner, J.R., Nolasco, S.M. and Tomás, M.C.** (2015) Physicochemical characterization and stability of chia oil microencapsulated with sodium caseinate and lactose by spray-drying. *Powder Technology*, 271, 26–34.

- Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., ... and Kikuchi, M. (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *The Journal of nutrition*, 130(7), 1695-1699.
- Jackson, C. J., Dini, J. P., Lavandier, C., Rupasinghe, H. P. V., Faulkner, H., Poysa, V., ... and De Grandis, S. (2002). Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process Biochemistry*, 37(10), 1117-1123.
- Jagannath, A., Raju, P. S., and Bawa, A. S. (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.
- Jankowiak, L., Kantzas, N., Boom, R. and van der Goot, A.J. (2014) Isoflavone extraction from okara using water as extractant. *Food Chem* 160:371-378. Jankowiak L, Trifunovic O, Boom RM, van der Goot AJ (2014) The potential of crude okara for isoflavone production. *Journal Food Energy*, 124:166-172. d
- Jang, S., Shin, W.K. and Kim, Y. (2019) Texture of steamed rice cake prepared via soy residue and hydroxypropyl methylcellulose supplementation. *Cereal Chemistry*, 96(1):57-65.
- Jiménez-Escrig, A., Tenorio, M. D., Espinosa-Martos, I., and Rupérez, P. (2008). Health-promoting effects of a dietary fiber concentrate from the soybean byproduct okara in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(16), 7495-7501.
- Jomaa, H. W., and Schlenoff, J. B. (2005). Salt-induced polyelectrolyte interdiffusion in multilayered films: A neutron reflectivity study. *Macromolecules*, 38(20), 8473-8480.
- Jonas, A. M., Glinel, K., Behrens, A., Anselmo, A. C., Langer, R. S., and Jaklenec, A. (2018). Controlling the Growth of *Staphylococcus epidermidis* by Layer-By-Layer Encapsulation. *ACS applied materials & interfaces*, 10(19), 16250-16259.
- Kabalnov, A. S., and Shchukin, E. D. (1992). Ostwald ripening theory: applications to fluorocarbon emulsion stability. *Advance Colloid Interface Science*, 38: 69-97
- Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., and Alakhov, V. Y. (2002). Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *Journal of controlled release*, 82(2-3), 189-212.
- Kakisu, E., Abraham, A.G., Tironi Farinati, C., Ibarra, C. and De Antoni, G.L. (2013) *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir protects vero cells from cytotoxicity by type-II Shiga toxin from *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Dairy Research*, 80, 64–71.
- Karasulu, H. Y., Karasulu, E., Büyükhelvacıgil, M., Yıldız, M., Ertugrul, A., Büyükhelvacıgil, K., ... and Gazel, N. (2011). Soybean oil: production process,

benefits and uses in pharmaceutical dosage form. In *Soybean and health*. IntechOpen.

- Karimi, R., Mortazavian, A. M., and Da Cruz, A. G.** (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy science h& technology*, 91(3), 283-308.
- Kashmiri, Z. N., and Mankar, S. A.** (2014). Free radicals and oxidative stress in bacteria. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3(9), 34-40.
- Kawakatsu, T., Kikuchi, Y., and Nakajima, M.** (1997). Regular-sized cell creation in microchannel emulsification by visual microprocessing method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(3), 317-321.
- Khare, S. K., Jha, K., and Gandhi, A. P.** (1995). Citric acid production from okara (soy-residue) by solid-state fermentation. *Bioresource technology*, 54(3), 323-325.
- Kim, E.H., Kim, S.H., Chung, J.I., Chi, H.Y., Kim, J.A. and Chung, I.M.** (2006) Analysis of phenolic compounds and isoflavones in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill) and sprouts grown under different conditions. *European Food Research and Technology*, 222(1-2):201-208.
- Klu, Y. A. K., Phillips, R. D., and Chen, J.** (2014). Survival of four commercial probiotic mixtures in full fat and reduced fat peanut butter. *Food microbiology*, 44, 34-40.
- Klu, Y. A. K., Williams, J. H., Phillips, R. D., and Chen, J.** (2012). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG as influenced by storage conditions and product matrixes. *Journal of food science*, 77(12), M659-M663.
- Kodicek, E.** (1963). Aspects of the constitution of bacterial membranes. *Recent progress in microbiology*, 8, 23-27.
- König, H., Uden, G., and Fröhlich, J.** (Eds.). (2009). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 3-30). Heidelberg: Springer.
- Kralova, I., and Sjöblom, J.** (2009). Surfactants used in food industry: a review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30(9), 1363-1383.
- Kuhn, K. R., and Cunha, R. L.** (2012). Flaxseed oil–whey protein isolate emulsions: effect of high pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 449-457.
- Kumar, R., and Katare, O. P.** (2005). Lecithin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: a review. *Aaps Pharmscitech*, 6(2), E298-E310.
- Kumar, V., Rani, A., Dixit, A.K., Pratap, D. and Bhatnagar, D.** (2010) A comparative assessment of total phenolic content, ferric reducing-anti-oxidative power, free radical-scavenging activity, vitamin C and isoflavones content in soybean with varying seed coat colour. *Food Research International*, 43(1):323-328.

- Kumar, R., and Atreja, S. K.** (2012). Effect of incorporation of additives in tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm tyrosine phosphorylation during cryopreservation. *Reproduction in domestic animals*, 47(3), 485-490.
- Lamberti, A., Marasso, S. L., and Cocuzza, M.** (2014). PDMS membranes with tunable gas permeability for microfluidic applications. *Rsc Advances*, 4(106), 61415-61419.
- Larena, I., Melgarejo, P., and De Cal, A.** (2003). Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against Fusarium wilt of tomato. *Journal of Phytopathology*, 151(11-12), 600-606.
- Larsson, A., Kuckling, D., and Schönhoff, M.** (2001). ¹H NMR of thermoreversible polymers in solution and at interfaces: the influence of charged groups on the phase transition. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 190(1-2), 185-192.
- Latheef, M. B. (2012).** *Pulsed ultrasound-assisted solvent extraction of oil from soybeans and microalgae*. McGill University (Canada).
- Lattimer, J. M., and Haub, M. D.** (2010). Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*, 2(12), 1266-1289.
- Leal-Calderon, F., Schmitt, V., and Bibette, J.** (2007). *Emulsion science: basic principles*. Springer Science & Business Media.
- Leong, T., Ashokkumar, M., and Kentish, S.** (2011). The fundamentals of power ultrasound-A review.
- Leslie, S. B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H., and Crowe, L. M.** (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(10), 3592-3597.
- Li, B., Qiao, M., and Lu, F.** (2012). Composition, nutrition, and utilization of okara (soybean residue). *Food Reviews International*, 28(3), 231-252.
- Li, C., Zhao, J. L., Wang, Y. T., Han, X., & Liu, N. (2009).** Synthesis of cyclopropane fatty acid and its effect on freeze-drying survival of *Lactobacillus bulgaricus* L2 at different growth conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), 1659-1665.
- Li, L. T., and Ma, Y. L.** (2014). Diversity of plant-based food products involving alkaline fermentation. *Handbook of Indigenous Foods Involving Alkaline Fermentation*, 78-87.
- Li, S., Zhu, D., Li, K., Yang, Y., Lei, Z., and Zhang, Z.** (2013). Soybean curd residue: composition, utilization, and related limiting factors. *ISRN Industrial Engineering*, 2013.
- Liu, M., Bienfait, B., Sacher, O., Gasteiger, J., Siezen, R. J., Nauta, A., and Geurts, J. M.** (2014). Combining chemoinformatics with bioinformatics: in silico prediction of

bacterial flavor-forming pathways by a chemical systems biology approach “reverse pathway engineering”. *PLoS One*, 9(1), e84769.

- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., and Chandra, N.** (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.
- Lodato, P., De Huergo, M. S., and Buera, M. P.** (1999). Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in different sugar and polymer matrices. *Applied microbiology and biotechnology*, 52(2), 215-220.
- Lopes, A. S., Garcia, J. S., Catharino, R. R., Santos, L. S., Eberlin, M. N., and Arruda, M. A. Z.** (2007). Cloud point extraction applied to casein proteins of cow milk and their identification by mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 590(2), 166-172.
- Louesdon, S., Charlot-Rougé, S., Tourdot-Maréchal, R., Bouix, M., and Béal, C.** (2014). Membrane fatty acid composition and fluidity are involved in the resistance to freezing of *L. actobacillus buchneri* R 1102 and *B. ifidobacterium longum* R 0175. *Microbial biotechnology*, 8(2), 311-318.
- Luan, F., Liu, H., Gao, Y., Li, Q., Zhang, X., and Guo, Y.** (2009). Prediction of hydrophile–lipophile balance values of anionic surfactants using a quantitative structure–property relationship. *Journal of colloid and interface science*, 336(2), 773-779.
- Ly, M. H., Aguedo, M., Goudot, S., Le, M. L., Cayot, P., Teixeira, J. A., ... and Waché, Y.** (2008). Interactions between bacterial surfaces and milk proteins, impact on food emulsions stability. *Food Hydrocolloids*, 22(5), 742-751.
- Ma, Y., Zhou, M. and Huang, H.** (2014) Changes of heat-treated soymilks in bioactive compounds and their antioxidant activities under in vitro gastrointestinal digestion. *European Food Research Technology*, 239(4): 637-652.
- Ma, W. D., Xu, H., Nie, S. F., and Pan, W. S.** (2008). Temperature-responsive, Pluronic-g-poly (acrylic acid) copolymers in situ gels for ophthalmic drug delivery: rheology, in vitro drug release, and in vivo resident property. *Drug development and industrial pharmacy*, 34(3), 258-266.
- Manning, G. S.** (1969). Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions I. Colligative properties. *The journal of chemical Physics*, 51(3), 924-933.
- Månsson, H.L.** (2008) Fatty acids in bovine milk fat. *Food & Nutrition Research*, 52, 1–3.
- Marilley, L., and Casey, M.** (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*, 90(2), 139-159.
- Marinetti, G.V.** (1993) “Isolation, analysis and identification of lipids,” in *Techniques of Lipidology*, eds M. Kates, H. R. Burdon, and P. H. Knippenberg (Amsterdam: Elsevier), 220–227.

- Marquis, M., Davy, J., Cathala, B., Fang, A., and Renard, D.** (2015). Microfluidics assisted generation of innovative polysaccharide hydrogel microparticles. *Carbohydrate polymers*, 116, 189-199.
- Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N., and Teixeira, J. A.** (2011). Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29(3), 365-373.
- Masterd, K.** (1976). *Spray Drying: An Introduction to Principles, Operational Practice and Applications*.
- Masters, K.** (1985). *Spray drying handbook*, (4th ed., 1991). London: Halsted Press
- Mateos-Aparicio, I., Mateos-Peinado, C., Jiménez-Escrig, A., and Rupérez, P.** (2010). Multifunctional antioxidant activity of polysaccharide fractions from the soybean byproduct okara. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 245-250.
- Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M. J., Zapata-Revilla, M. A., and Tenorio-Sanz, M. D.** (2010a). Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *LWT-Food Science and Technology*, 43(9), 1467-1470.
- Matsumoto, K., Watanabe, Y., and Yokoyama, S. I.** (2007). Okara, soybean residue, prevents obesity in a diet-induced murine obesity model. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 0702080286-0702080286.
- Matthaus, B., Özcan, M.M. and Al Juhaimi, F.** (2016) Some rape/canola seed oils: Fatty acid composition and tocopherols. *Zeitschrift für Naturforschung. Section C*, 71, 73–77.
- Mazutis, L., Vasiliauskas, R., and Weitz, D. A.** (2015). Microfluidic production of alginate hydrogel particles for antibody encapsulation and release. *Macromolecular bioscience*, 15(12), 1641-1646.
- McCleary, B.V.** (2007) An integrated procedure for the measurement of total dietary fibre (including resistant starch), non-digestible oligosaccharides and available carbohydrates. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389, 291–308.
- McClements, D.J.** (1999). *Food emulsions: Principles, practice and techniques*. Florida: CRC Press.
- McClements DJ** (2005b). Emulsion Stability. In: *Food emulsions, principles, practices and techniques*, second edition. Ed. CRC Press, New York, USA, pp. 269-339.
- McClements, D. J.** (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.
- McClements, D. J.** (2016). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.

- McClements, D. J., & Li, Y.** (2010). Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in colloid and interface science*, 159(2), 213-228.
- McClements, D. J., and Weiss, J.** (2005). Lipid emulsions. *Bailey's industrial oil and fat products*.
- Melik, D. H., and Fogler, H. S.** (1988). Fundamentals of colloidal stability in quiescent media. *Encyclopedia of emulsion technology*, 3: 3-78
- Mendoza-Llerenas, E.O., Pérez, D.J., Gómez-Sandoval, Z., Escalante-Minakata, P., Ibarra-Junquera, V. and Razo-Hernández, R.S.** (2016). *Lactobacillus plantarum* WCFS1 b-fructosidase: evidence for an open funnel-like channel through the catalytic domain with importance for the substrate selectivity. *Applied biochemistry and biotechnology*, 180, 1056–1075.
- Merchant, A. T., Hu, F. B., Spiegelman, D., Willett, W. C., Rimm, E. B., and Ascherio, A.** (2003). Dietary fiber reduces peripheral arterial disease risk in men. *The Journal of nutrition*, 133(11), 3658-3663.
- Meyer, K. A., Kushi, L. H., Jacobs Jr, D. R., Slavin, J., Sellers, T. A., and Folsom, A. R.** (2000). Carbohydrates, dietary fiber, and incident type 2 diabetes in older women. *The American journal of clinical nutrition*, 71(4), 921-930.
- Miettinen, P., & Hämäläinen, R. P.** (1997). How to benefit from decision analysis in environmental life cycle assessment (LCA). *European Journal of operational research*, 102(2), 279-294.
- Miyagawa, Y. and Adachi, S.** (2017) Dispersion and oxidative stability of O/W emulsions and oxidation of microencapsulated oil. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81, 625–633.
- Mohammadi, R., Mortazavian, A. M., Khosrokhavar, R., and da Cruz, A. G.** (2011). Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Annals of microbiology*, 61(3), 411-424.
- Molin, G.** (2008). *Lactobacillus plantarum*: the role in foods and in human health. *Handbook of Fermented Functional Foods*. (2 nd. Ed.): CRC Press.
- Mootoosingh, K. S., and Rousseau, D.** (2006). Emulsions for the Delivery of Nutraceutical Lipids. *Nutraceutical Science and Technology*, 5, 281.
- Moreau, D. L., and Rosenberg, M.** (1999). Porosity of microcapsules with wall systems consisting of whey proteins and lactose measured by gas displacement pycnometry. *Journal of food science*, 64(3), 405-409.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., and Vesey, G.** (2006). Preservation of microorganisms by drying; a review. *Journal of microbiological methods*, 66(2), 183-193.

- Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., and Sohrabvandi, S.** (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms.
- Mortazavian, A. M., Mohammadi, R., and Sohrabvandi, S.** (2012). Delivery of probiotic microorganisms into gastrointestinal tract by food products. *New advances in the basic and clinical gastroenterology*, 59, 123-127.
- Mota de Carvalho, N., Costa, E., Silva, S., Pimentel, L., Fernandes, T., and Pintado, M.** (2018). Fermented foods and beverages in human diet and their influence on gut microbiota and health. *Fermentation*, 4(4), 90.
- Muller, J.A., Ross, R.P., Sybesma, W.F.H., Fitzgerald, G.F. and Stanton, C.** (2011) Modification of the technical properties of *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 by supplementing the growth medium with unsaturated fatty acids. *Applied Environment Microbiology*, 77, 6889–6898.
- Muroyama, K., Atsumi, R., and Andoh, A.** (2006). Effect of pretreatment on lactic acid fermentation of bean curd refuse with simultaneous saccharification. *Studies in surface science and catalysis*, 133-136.
- Namiki, M.** (1990). Antioxidants/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 29(4), 273-300.
- Neira-Carrillo, A., Muñoz, D. Y., Zazzali, P. A., Marini, Y. A., Vilches, S. V., and Palma, R. E.** (2013). Encapsulación de biomoléculas usando polímeros naturales: “un nuevo enfoque en la entrega de fármacos en medicina”. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 28(2), pág-31.
- Nikolopoulou, D., Grigorakis, K., Stasini, M., Alexis, M., and Iliadis, K.** (2006). Effects of cultivation area and year on proximate composition and antinutrients in three different kabuli-type chickpea (*Cicer arietinum*) varieties. *European Food Research and Technology*, 223(6), 737-741.
- Ningtyas, D. W., Bhandari, B., Bansal, N., and Prakash, S.** (2019). The viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (non-encapsulated and encapsulated) in functional reduced-fat cream cheese and its textural properties during storage. *Food control*, 100, 8-16.
- Niu, X., and de Mello, A. J.** (2012). Building droplet-based microfluidic systems for biological analysis. *Biochemical Society Transactions*, 40(4).
- Norde W. Interfacial tension.** (2003) In: Norde W (ed.) *Colloid and interfaces in life sciences*. New York: Marcel Dekker; 2003. p47–61.
- Nzikou, J. M., Matos, L., Bouanga-Kalou, G., Ndangui, C. B., Pambou-Tobi, N. P. G., Kimbouguila, A. and Desobry, S.** (2009) Chemical composition of the seeds and oil of sesame (*Sesamum indicum* L.) grown in Congo-Brazzaville. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 1, 6–11.

- Organización Internacional de Normalización (ISO).** (2016). ISO 14040: Environmental Management - *Life Cycle Assessment-Principles and Framework*. Geneva, Switzerland.
- Organización Internacional de Normalización.** (2006). ISO 14040. Environmental management–life cycle assessment–principles and framework. *London: British standards Institution*.
- Ortiz de Orué Lucana, D., Wedderhoff, I., and Groves, M. R.** (2012). ROS-mediated signalling in bacteria: zinc-containing Cys-XX-Cys redox centres and iron-based oxidative stress. *Journal of signal transduction*, 2012.
- O'Toole, D. K.** (1999). Characteristics and use of okara, the soybean residue from soy milk production a review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(2), 363-371.
- Ötles, S., and Ozgoz, S.** (2014). Health effects of dietary fiber. *Acta scientiarum polonorum Technologia alimentaria*, 13(2), 191-202.
- Palazolo, G. G.** (2006). *Formación y estabilidad de emulsiones O/W preparadas con proteínas nativas y desnaturalizadas de soja* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Parada, J. and Aguilera, J.M.** (2007) Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2):R21-R32.
- Partanen, R., Hakala, P., Sjövall, O., Kallio, H. and Forssell, P.** (2005) Effect of relative humidity on the oxidative stability of microencapsulated sea buckthorn seed oil. *Journal of Food Science*, 70, E37–E43.
- Patel, S., and Goyal, A.** (2013). Evolving roles of probiotics in cancer prophylaxis and therapy. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 5(1), 59-67.
- Pénicaud, C., Monclus, V., Perret, B., Passot, S., and Fonseca, F.** (2018). Life cycle assessment of the production of stabilized lactic acid bacteria for the environmentally-friendly preservation of living cells. *Journal of Cleaner Production*, 184, 847-858.
- Peñalvo, J.L., Castilho, M.C., Silveira, M.I. N., Matallana, M.C. and Torija, M.E.** (2004). Fatty acid profile of traditional soymilk. *European Food Research Technology*, 219, 251–253.
- Perdana, J., Bereschenko, L., Fox, M. B., Kuperus, J. H., Kleerebezem, M., Boom, R. M., and Schutyser, M. A.** (2013). Dehydration and thermal inactivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Comparing single droplet drying to spray and freeze drying. *Food Research International*, 54(2), 1351-1359.
- Pereyra Boué, M.M., Costamagna, D., Rodríguez, P., Speltini, C. and Coppo, G.** (2009) Auto-oxidation of commercial vegetable oils. *Rumbos Tecnológicos*, 1, 53–63.

- Pérez-López, E., Cela, D., Costabile, A., Mateos-Aparicio, I., and Rupérez, P.** (2016). In vitro fermentability and prebiotic potential of soyabean Okara by human faecal microbiota. *British Journal of Nutrition*, 116(6), 1116-1124.
- Perry, S. F.** (1998). Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Molecular Biotechnology*, 9(1), 59-64.
- Peyratout, C. S., and Daehne, L.** (2004). Tailor-made polyelectrolyte microcapsules: from multilayers to smart containers. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(29), 3762-3783.
- Phuapaboon, P., Leenanon, B., and Levin, R. E.** (2013). Effect of Lactococcus lactis immobilized within pineapple and yam bean segments, and jerusalem artichoke powder on its viability and quality of yogurt. *Food and Bioprocess Technology*, 6(10), 2751-2762.
- Piastrellini, R., Arena, A. P., and Civit, B.** (2014). Análisis de Ciclo de Vida de la cadena productiva de la soja (Glycine max) como cultivo energético. *Suelos, producción agropecuaria y cambio climático: avances en la Argentina*, 515-525.
- Picot, A., and Lacroix, C.** (2003). Effects of micronization on viability and thermotolerance of probiotic freeze-dried cultures. *International Dairy Journal*, 13(6), 455-462.
- Pimentel-González, D.J., Campos-Montiel, R.G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R. and Vernon-Carter, E.J.** (2009) Encapsulation of Lactobacillus rhamnosus in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 42, 292–297.
- Pinto, J., Spínola, V., Llorent-Martínez, E.J., Fernández de Córdoba, M.L., Molina-García, L. and Castilho, P.C.** (2017) Polyphenolic profile and antioxidant activities of Madeiran elderberry (*Sambucus lanceolata*) as affected by simulated *in vitro* digestion. *Food Research International*, 100:404-410.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... and Bitto, A.** (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Pizzol, M., Christensen, P., Schmidt, J., and Thomsen, M.** (2011). Impacts of “metals” on human health: a comparison between nine different methodologies for Life Cycle Impact Assessment (LCIA). *Journal of Cleaner Production*, 19(6-7), 646-656.
- Préstamo, G., Rupérez, P., Espinosa-Martos, I., Villanueva, M. J., and Lasunción, M. A.** (2007). The effects of okara on rat growth, cecal fermentation, and serum lipids. *European Food Research and Technology*, 225(5-6), 925-928.
- Pokorný, J., Yanishlieva, N., and Gordon, M.** (Eds.). (2001). *Antioxidants in food: practical applications*. Elsevier.

- Poshadri, A., and Aparna, K.** (2010). Microencapsulation technology: a review. *Journal of Research ANGRAU*, 38(1), 86-102.
- Prosapio, V., Norton, I., and De Marco, I.** (2017). Optimization of freeze-drying using a Life Cycle Assessment approach: Strawberries' case study. *Journal of cleaner production*, 168, 1171-1179.
- Putta, S., Yarla, N. S., Lakkappa, D. B., Imandi, S. B., Malla, R. R., Chaitanya, A. K., ... and Tarasov, V. V.** (2018). Probiotics: Supplements, food, pharmaceutical industry. In *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods* (pp. 15-25). Academic Press.
- Qiu, X., Leporatti, S., Donath, E., and Möhwald, H.** (2001). Studies on the drug release properties of polysaccharide multilayers encapsulated ibuprofen microparticles. *Langmuir*, 17(17), 5375-5380.
- Quitain, A.T., Oro, K., Shunsaku, K. and Moriyoshi, T.** (2006) Recovery of oil components of okara by ethanol-modified supercritical carbon dioxide extraction. *Bioresource Technology*, 97, 1509 –1514.
- Quintana, G., Gerbino, E. and Gómez-Zavaglia, A.** (2017). Okara: a nutritionally valuable by-product able to stabilize *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, spray-drying, and storage. *Frontier Microbiology*, 8:641.
- Quintana, G., Gerbino, E. and Gomez-Zavaglia, A.** (2018). Valorization of okara oil for the encapsulation of *Lactobacillus plantarum*. *Food Research International*, 106:81.
- Quintana, G., Simões, M. G., Hugo, A., Alves, P., Ferreira, P., Gerbino, E., ... and Gómez-Zavaglia, A.** (2017b). Layer-by-layer encapsulation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* using block-copolymers of poly (acrylic acid) and pluronic for safe release in gastro-intestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 35, 408-417.
- Radočaj, O. and Dimic, E.** (2013). Valorization of wet okara, a value-added functional ingredient, in a coconut-based baked snack. *Cereal Chemistry*, 90(3):256-262.
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., and Adams, M. C.** (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food research international*, 43(1), 1-7.
- Rastall, R. A., and Gibson, G. R.** (2015). Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 42-46.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C.** (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med*, 26(9-10):1231-1237.

- Rebitzer, G., Ekvall, T., Frischknecht, R., Hunkeler, D., Norris, G., Rydberg, T., ... and Pennington, D. W. (2004).** Life cycle assessment: Part 1: Framework, goal and scope definition, inventory analysis, and applications. *Environment international*, 30(5), 701-720.
- Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M. J., and Mateos-Aparicio, I. (2008).** Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods. *Food chemistry*, 108(3), 1099-1105.
- Reitermayer, D., Kafka, T. A., Lenz, C. A., and Vogel, R. F. (2018).** Interrelation between Tween and the membrane properties and high pressure tolerance of *Lactobacillus plantarum*. *BMC microbiology*, 18(1), 72.
- Riaz, M. N. (2006).** *Soy applications in food*. CRC press.
- Riveros, B., Ferrer, J., and Borquez, R. (2009).** Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Drying Technology*, 27(1), 123-132.
- Robins, M. M., Watson, A. D., and Wilde, P. J. (2002).** Emulsions creaming and rheology. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(5-6), 419-425.
- Rodgers, S. (2008).** Novel applications of live bacteria in food services: probiotics and protective cultures. *Trends in Food Science & Technology*, 19(4), 188-197.
- Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., Gómez-Cordovés, C., . . .and Muñoz, R. (2009).** Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2-3), 79-90.
- Rodríguez-Huezo, M.E., Estrada-Fernandez, A.G., García-Almendarez, B.E., Ludena-Urquizo, F., Campos-Montiel, R.G. and Pimentel-Gonzalez, D.J. (2014)** Viability of *Lactobacillus plantarum* entrapped in double emulsion during Oaxaca cheese manufacture, melting and simulated intestinal conditions. *Food Science and Technology*, 59, 768-773.
- Rodríguez-Roque, M.J., Rojas-Graü, M.A., Elez-Martínez, P. and Martín-Belloso, O. (2013).** Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 136(1), 206-212.
- Rokka, S., & Rantamäki, P. (2010).** Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, 231(1), 1-12.
- SaaRomano, N., Schebor, C., Mobili, P., and Gómez-Zavaglia, A. (2016).** Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Research International*, 90, 251-258.
- Romano, N., Tavera-Quiroz, M.J., Bertola, N., Mobili, P., Pinotti, A. and Gómez-Zavaglia, A. (2014).** Edible methylcellulose-based films containing

fructooligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 560–566.

- Romano, N., Tymczyszyn, E., Mobili, A., and Gómez-Zavaglia, A.** (2015). Prebiotics as protectants of lactic acid bacteria. *Bioactive foods in promoting health: probiotics, prebiotics, and synbiotics. Part, 1* (pp.155-164): Elsevier.
- Ruano Aldea, M.** (2013). *Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).a
- Russell, J. B., and Diez-Gonzalez, F.** (1997). The effects of fermentation acids on bacterial growth. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 39, pp. 205-234). Academic Press.
- Rybkin, I., Gorin, D., Sukhorukov, G., and Lapanje, A.** (2019). Thickness of polyelectrolyte layers of separately confined bacteria alters key physiological parameters on a single cell level. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 378.
- Rydhag, L., and Wilton, I.** (1981). The function of phospholipids of soybean lecithin in emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(8), 830-837.
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H.-L., Mattila-Sandholm, T., Vaari, A., Suomalainen, T., and Mättö, J.** (2005). Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and 157 acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. *Journal of Applied Microbiology*, 99(6), 1330-9.
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Nohynek, L., Vaari, A., and Mättö, J.** (2006). Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *International journal of food microbiology*, 112(2), 171-178.
- Sadras, V., and Calderini, D.** (2009). *Crop physiology: applications for genetic improvement and agronomy*. Academic Press.
- Sander, A. and Penovic, T.** (2014). Droplet size distribution obtained by atomization with two-fluid nozzles in a spray-dryer. *Chemical Engineering and Technology*, 37, 1–13.
- Sanders, M. E., and Marco, M. L.** (2010). Food formats for effective delivery of probiotics. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 65-85.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J., and Vernon-Carter, E. J.** (2010). Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43(1), 111-117.

- Sanguansri, L., and Augustin, M. A.** (2007). Microencapsulation and Delivery of Omega-3 Fatty Acids. *Functional food ingredients and nutraceuticals*. 297-320.
- Sanjukta, S., Rai, A.K., Muhammed, A., Jeyaram, K. and Talukdar, N.C.** (2015). Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation. *Journal of Functional Foods*, 14:650-658.
- Santivarangkna, C., Wenning, M., Foerst, P., and Kulozik, U.** (2007). Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *Journal of applied microbiology*, 102(3), 748-756.
- Santos, M., Gerbino, E., Araujo-Andrade, C., Tymczyszyn, E.E., and Gomez-Zavaglia, A.** (2014). Stability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* in the presence of galacto-oligosaccharides and lactulose as determined by near infrared spectroscopy. *Food Research International*. 59, 53–60.
- Santos, V.A.Q., Nascimento, C.G., Schimidt, C.A., Mantovani, D., Dekke, R.F. and da Cunha, M.A.A.** (2018). Solid-state fermentation of soybean okara: Isoflavones biotransformation, antioxidant activity and enhancement of nutritional quality. *LWT-Food Science and Technology*, 92:509-515.
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., and Hernández-Carlos, B.** (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In *Antioxidants*. IntechOpen.
- Savini, M., Cecchini, C., Verdenelli, M. C., Silvi, S., Orpianesi, C., and Cresci, A.** (2010). Pilot-scale production and viability analysis of freeze-dried probiotic bacteria using different protective agents. *Nutrients*, 2(3), 330-339.
- Sawada, M. M., Venâncio, L. L., Toda, T. A., and Rodrigues, C. E.** (2014). Effects of different alcoholic extraction conditions on soybean oil yield, fatty acid composition and protein solubility of defatted meal. *Food research international*, 62, 662-670.
- Saxelin, M., Lassig, A., Karjalainen, H., Tynkkynen, S., Surakka, A., Vapaatalo, H., ... and Hatakka, K.** (2010). Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. *International journal of food microbiology*, 144(2), 293-300.
- Sendra, E., Fayos, P., Lario, Y., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., and Pérez-Alvarez, J. A.** (2008). Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food microbiology*, 25(1), 13-21.
- Serdaroğlu, M., Öztürk, B., and Kara, A.** (2015). An overview of food emulsions: description, classification and recent potential applications. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 3(6), 430-438.

- Schlenoff, J. B., and Dubas, S. T.** (2001). Mechanism of polyelectrolyte multilayer growth: charge overcompensation and distribution. *Macromolecules*, 34(3), 592-598.
- Schneider, G., and Decher, G.** (2008). Functional core/shell nanoparticles via layer-by-layer assembly. Investigation of the experimental parameters for controlling particle aggregation and for enhancing dispersion stability. *Langmuir*, 24(5), 1778-1789.
- Schönhoff, M.** (2001). of Book: Novel methods to study interfacial layers. *Elsevier Science*.
- Schubert, H.** (1997). Advances in the mechanical production of food emulsions. In *Proceedings of Engineering and Food at ICEF 7. ICEF-Conference, 1997* (pp. AA82-AA87).
- Schulze, M. B., Liu, S., Rimm, E. B., Manson, J. E., Willett, W. C., and Hu, F. B.** (2004). Glycemic index, glycemic load, and dietary fiber intake and incidence of type 2 diabetes in younger and middle-aged women. *The American journal of clinical nutrition*, 80(2), 348-356.
- Scialabba, N. E.** (2014). Food wastage footprint: full-cost accounting). Food wastage footprint: Full-cost accounting. <http://www.fao.org/3/a-i3991e.pdf> Accessed 01.01.16.)
- Shah, N. P., and Lankaputhra, W. E.** (1997). Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. *International Dairy Journal*, 7(5), 349-356.
- Singh, A., Meena, M., Kumar, D., Dubey, A. K., and Hassan, M. I.** (2015). Structural and functional analysis of various globulin proteins from soy seed. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(11), 1491-1502.
- Singh, H.** (2010). Protein interactions and functionality of milk protein products. In *Dairy-Derived Ingredients* (pp. 644-674). Woodhead Publishing.
- Singh, P., Sharma, S., and Kumar Rath, S.** (2014). Genistein induces deleterious effects during its acute exposure in Swiss mice. *BioMed research international*, 2014.
- Singh, R. P., and Heldman, D. R.** (2013). *Introduction to Food Engineering, Enhanced*. Academic Press.
- Slavin, J.** (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5(4), 1417-1435.
- Smittle, R.B., Gilliland, S.E., Speck, M.L. and Walter, W.M. Jr.** (1974) Relationship of cellular fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen. *Applied Microbiology*, 27, 738-743.

- Solanki, H. K., Pawar, D. D., Shah, D. A., Prajapati, V. D., Jani, G. K., Mulla, A. M., and Thakar, P. M.** (2013). Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *BioMed research international*, 2013.
- Sosa, N., Gerbino, E., Golowczyc, M.A., Schebor, C., Gómez-Zavaglia, A., and Tymczyszyn, E.E.** (2016) Effect of galacto-oligosaccharides: maltodextrin matrices on the recovery of *Lactobacillus plantarum* after spray-drying. *Frontier Microbiology*, 7:584.
- Stang, M., Schuchmann, H., and Schubert, H.** (2001). Emulsification in high-pressure homogenizers. *Engineering in Life Sciences*, 1(4), 151-157.
- Stanojevic, S. P., Barac, M. B., Pesic, M. B., Jankovic, V. S., and Vucelic-Radovic, B. V.** (2013). Bioactive proteins and energy value of okara as a byproduct in hydrothermal processing of soy milk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(38), 9210-9219.
- Stanton, C., Desmond, C., Fitzgerald, G., and Ross, R. P.** (2003). Probiotic health benefits-reality or myth?. *Australian journal of dairy technology*, 58(2), 107.
- Starr, G., Petersen, M. A., Jespersen, B., and Hansen, Å. S.** (2015). Variation of volatile compounds among wheat varieties and landraces. *Food Chemistry*, 174, 527-537.
- Steinkraus, K. H.** (2002). Fermentations in world food processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(1), 23-32.
- Soni, S., and Dey, G.** (2014). Perspectives on global fermented foods. *British Food Journal*, 116(11), 1767-1787.
- Sukhorukov, G. B., Donath, E., Lichtenfeld, H., Knippel, E., Knippel, M., Budde, A., and Möhwald, H.** (1998). Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, 137(1-3), 253-266.
- Tamang, J. P., Watanabe, K., and Holzapfel, W. H.** (2016). Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7, 377.
- Taneja, A., Ye, A., and Singh, H.** (2015). Influence of protein concentration on the stability of oil-in-water emulsions formed with aggregated milk proteins during spray drying. *Dairy science & technology*, 95(3), 279-293.
- Tavera-Quiroz, M. J., Romano, N., Mobili, P., Pinotti, A., Gómez-Zavaglia, A., and Bertola, N.** (2015). Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of methylcellulose containing *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Functional Foods*, 16, 164-173.
- Taylor, P.** (1995). Ostwald ripening in emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 99 (2): 175-185

- Teixeira, P., Castro, H., and Kirby, R.** (1995). Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(4), 456-462.
- Tenorio, M. D., Espinosa-Martos, I., Préstamo, G., and Rupérez, P.** (2010). Soybean whey enhance mineral balance and caecal fermentation in rats. *European journal of nutrition*, 49(3), 155-163.
- Teo, A., Goh, K. K., Wen, J., Oey, I., Ko, S., Kwak, H. S., and Lee, S. J.** (2016). Physicochemical properties of whey protein, lactoferrin and Tween 20 stabilised nanoemulsions: Effect of temperature, pH and salt. *Food chemistry*, 197, 297-306.
- Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Bosnea, L. A., and Kopsahelis, N.** (2019). Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. *Nutrients*, 11(7), 1591.
- Thammavongs, B., Poncet, J. M., Desmasures, N., Guéguen, M., and Panoff, J. M.** (2004). Resin straw as an alternative system to securely store frozen microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 57(2), 181-186.
- Thunell, R. K., Sandine, W. E., and Bodyfelt, F. W.** (1984). Frozen Starters from Internal-pH-Control-Grown Cultures. *Journal of Dairy Science*, 67(1), 24-36.
- Tripathi, M. K., and Giri, S. K.** (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*, 9, 225-241.
- Tsao, C. W.** (2016). Polymer microfluidics: Simple, low-cost fabrication process bridging academic lab research to commercialized production. *Micromachines*, 7(12), 225.
- Tseng, Y. C., Tseng, H. C., and Weng, Y. M.** (2013). Hydrolyzed okara in low-fat pork burgers under pilot scale. In *Advanced Materials Research* (Vol. 726, pp. 2908-2916). Trans Tech Publications Ltd.
- Tu, Z., Chen, L., Wang, H., Ruan, C., Zhang, L., and Kou, Y.** (2014). Effect of fermentation and dynamic high pressure microfluidization on dietary fibre of soybean residue. *Journal of food science and technology*, 51(11), 3285-3292.
- Tucker, L. A., and Thomas, K. S.** (2009). Increasing total fiber intake reduces risk of weight and fat gains in women. *The Journal of nutrition*, 139(3), 576-581.
- Tymczyszyn, E.E., Díaz, M.R., Gómez-Zavaglia, A. and Disalvo, E.A.** (2007a) Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2410–2419.
- Tymczyszyn, E.E., Díaz, R., Pataro, A., Sandonato, N., Gómez-Zavaglia, A. and Disalvo, E.A.** (2008). Critical water activity for the preservation of *Lactobacillus bulgaricus* by vacuum drying. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 342–347.

- Tymczyszyn, E.E., Gomez-Zavaglia, A. and Disalvo, E.A.** (2005) Influence of the growth at high osmolality on the lipid composition, water permeability and osmotic response of *Lactobacillus bulgaricus*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 443, 66–73.
- Tymczyszyn, E. E., Gerbino, E., Illanes, A., and Gómez-Zavaglia, A.** (2011). Galacto-oligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Cryobiology*, 62(2), 123-129.
- Tymczyszyn, E. E., Sosa, N., Gerbino, E., Hugo, A., Gómez-Zavaglia, A., and Schebor, C.** (2012). Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 217-221.
- Urban, K., Wagner, G., Schaffner, D., Röglin, D., and Ulrich, J.** (2006). Rotor-stator and disc systems for emulsification processes. *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry-Plant Equipment-Process Engineering-Biotechnology*, 29(1), 24-31.
- USDA** (2017). United States department of agriculture. World Agricultural Supply and Demand Estimates. <http://www.usda.gov> Accessed in: 21 de junho de 2017.
- Utada, A. S., Lorenceau, E., Link, D. R., Kaplan, P. D., Stone, H. A., and Weitz, D. A.** (2005). Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device. *Science*, 308(5721), 537-541.
- Utech, S., Prodanovic, R., Mao, A. S., Ostafe, R., Mooney, D. J., and Weitz, D. A.** (2015). Microfluidic generation of monodisperse, structurally homogeneous alginate microgels for cell encapsulation and 3D cell culture. *Advanced healthcare materials*, 4(11), 1628-1633.
- van Boekel, M., Fogliano, V., Pellegrini, N., Stanton, C., Scholz, G., Lalljie, S., . . .and Eisenbrand, G.** (2010). A review on the beneficial aspects of food processing. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(9), 1215-1247.
- van der Riet, W. B., Wight, A. W., Cilliers, J. J. L., and Datel, J. M.** (1989). Food chemical investigation of tofu and its byproduct okara. *Food Chemistry*, 34(3), 193-202.
- van Nieuwenhuyzen, W., and Szuhaj, B. F.** (1998). Effects of lecithins and proteins on the stability of emulsions. *Lipid/Fett*, 100(7), 282-291.
- Vázquez, J. A., Nogueira, M., Durán, A., Prieto, M. A., Rodríguez-Amado, I., Rial, D., ... and Murado, M. A.** (2011). Preparation of marine silage of swordfish, ray and shark visceral waste by lactic acid bacteria. *Journal of Food engineering*, 103(4), 442-448.
- Velderrain-Rodriguez, G., Quiros-Sauceda, A., Mercado-Mercado, G., Ayala-Zavala, J.F., Astiazaran-Garcia, H., Robles-Sánchez, R.M., Wall-Medrano, A., Sayago-Ayerdi, S. and González-Aguilar, G.A.** (2016). Effect of dietary fiber on the

bioaccessibility of phenolic compounds of mango, papaya and pineapple fruits by an *in vitro* digestion model. *Food Science and Technology*, 36(2), 188-194.

- Ventureira, J. L.** (2010). Propiedades estructurales y funcionales de preparados proteicos de amaranto modificados y soja-amaranto. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata.
- Vesterlund, S., Salminen, K., and Salminen, S.** (2012). Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 319-321.
- Villanueva-Suárez, M. J., Pérez-Cózar, M. L., Mateos-Aparicio, I., and Redondo-Cuenca, A.** (2016). Potential fat-lowering and prebiotic effects of enzymatically treated okara in high-cholesterol-fed Wistar rats. *International journal of food sciences and nutrition*, 67(7), 828-833.
- Vinderola, C. G., Bailo, N., and Reinheimer, J. A.** (2000). Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33(2), 97-102.
- Vinderola, G., Zacarías, M. F., Bockelmann, W., Neve, H., Reinheimer, J., and Heller, K. J.** (2012). Preservation of functionality of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 after incorporation of freeze-dried cells into different food matrices. *Food microbiology*, 30(1), 274-280.
- Vinner, G. K., Vladislavljević, G. T., Clokie, M. R., and Malik, D. J.** (2017). Microencapsulation of *Clostridium difficile* specific bacteriophages using microfluidic glass capillary devices for colon delivery using pH triggered release. *PLoS One*, 12(10).
- Vital, A.C.P., Croge, C., da Silva, D.F., Araújo, P.J., Gallina, M.Z. and Matumoto-Pintro, T.** (2018) Okara residue as source of antioxidants against lipid oxidation in milk enriched with omega-3 and bioavailability of bioactive compounds after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Journal of Food Science Technology*, 55(4):1518-1524.
- Vlasova, A. N., Kandasamy, S., Chattha, K. S., Rajashekara, G., and Saif, L. J.** (2016). Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Veterinary immunology and immunopathology*, 172, 72-84.
- Voigt, U., Khrenov, V., Tauer, K., Hahn, M., Jaeger, W., and von Klitzing, R.** (2002). The effect of polymer charge density and charge distribution on the formation of multilayers. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 15(1), S213.
- Vong, W. C., and Liu, S. Q.** (2016). Biovalorisation of okara (soybean residue) for food and nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 139-147.

- Wagner J R** (2000). Propiedades superficiales. En: Caracterización funcional y estructural de proteínas. Ed. Bartholomai G B y Pilosof A M R, Eudeba, Buenos Aires (Argentina)
- Wahab, S. A., Ahmed, M. A., Radwan, F. A., Hassan, R. M., and El-Refae, A. M.** (1997). Relative permittivity and electrical conductivity of some divalent metal alginate complexes. *Materials Letters*, 30(2-3), 183-188.
- Walstra P** (1983). Formation of emulsion. In: Encyclopedia of Emulsion Technology: Basic Theory. Ed. Becher, P., Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 57-127.
- Walstra P** (1996). Emulsion stability. En Encyclopedia of Emulsion Technology, Vol. 4. Ed. Becher, P., Marcel Dekker Inc., New York (USA)
- Walstra P, Smulder PEA.** (1988). Emulsion formation. In Modern Aspects of Emulsion Science, B. P. Binks, ed. *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, UK, pp. 56–99.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M. and Geurts, T.J.** (2005) Dairy science and technology (2nd Edition). Boca Raton (USA): CRC Taylor and Francis.
- Wang, H. J., and Murphy, P. A.** (1996). Mass balance study of isoflavones during soybean processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2377-2383.
- Wang, Y. C., Yu, R. C., and 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(2), 209-217.
- Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P., and Morris, V.** (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108, 63-71.
- Wilkinson, M. G.** (2018). Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: a review.
- Würth, R., Hörmannspurger, G., Wilke, J., Foerst, P., Haller, D., and Kulozik, U.** (2015). Protective effect of milk protein based microencapsulation on bacterial survival in simulated gastric juice versus the murine gastrointestinal system. *Journal of functional foods*, 15, 116-125.
- Wyżkiewicz, I., Lewandowska, N., Chudy, M., Brzózka, Z., Magoński, Z., Dziurdzia, B., ... and Dybko, A.** (2007). A new technology for microfluidic structures preparation based on a photoimageable ceramic. *Microsystem technologies*, 13(7), 657-661.
- Xu, L., Du, B., and Xu, B.** (2015). A systematic, comparative study on the beneficial health components and antioxidant activities of commercially fermented soy products marketed in China. *Food Chemistry*, 174, 202-213.
- Yadav, M. P., Igartuburu, J. M., Yan, Y., and Nothnagel, E. A.** (2007). Chemical investigation of the structural basis of the emulsifying activity of gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 21(2), 297-308.

- Ybran, R., and Lacelli, A.** (2016). Informe estadístico mercado de soja. *Cuba: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA.*
- Yeo, S. K., Ewe, J. A., Tham, C. S. C., and Liong, M. T.** (2011). Carriers of probiotic microorganisms. In *Probiotics* (pp. 191-220). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ying, D. Y., Phoon, M. C., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Burgar, I., and Augustin, M. A.** (2010). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. *Journal of Food Science*, 75(9), E588-E595.
- Yokomizo, A., Takenaka, Y., and Takenaka, T.** (2002). Antioxidative activity of peptides prepared from okara protein. *Food Science and Technology Research*, 8(4), 357-359.
- Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., and Fisk, I.** (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. *Journal of functional foods*, 6, 205-214.
- Younes, M., Aquilina, G., Castle, L., Engel, K. H., Fowler, P., ... and Husøy, T.** (2020). Safety of use of oat lecithin as a food additive. *EFSA Journal*, EFSA Panel on Food Additives and Flavourings (FAF), 18(1), e05969.
- Zhang, L. W., Al-Suwayeh, S. A., Hung, C. F., Chen, C. C., and Fang, J. Y.** (2011). Oil components modulate the skin delivery of 5-aminolevulinic acid and its ester prodrug from oil-in-water and water-in-oil nanoemulsions. *International journal of nanomedicine*, 6, 693.
- Zhang, Y., Lin, J. and Zhong, O.** (2015) The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. *Food Research International*, 71, 9–15.
- 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(2), 333-338.
- Zheng, L., and Sun, D. W.** (2006). Innovative applications of power ultrasound during food freezing processes - A review. *Trends in Food Science and Technology*.
- Zotta, T., Tabanelli, G., Montanari, C., Ianniello, R. G., Parente, E., Gardini, F., and Ricciardi, A.** (2016). Tween 80 and respiratory growth affect metabolite production and membrane fatty acids in *Lactobacillus casei* N87. *Journal of applied microbiology*, 122(3), 759-769.
- Zuidam, N. J., and Shimoni, E.** (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 3-29). Springer, New York, NY.e