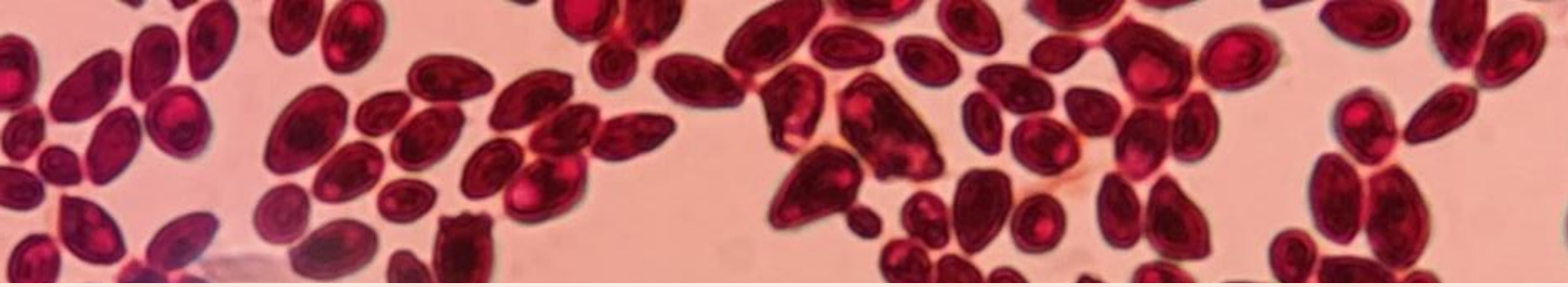
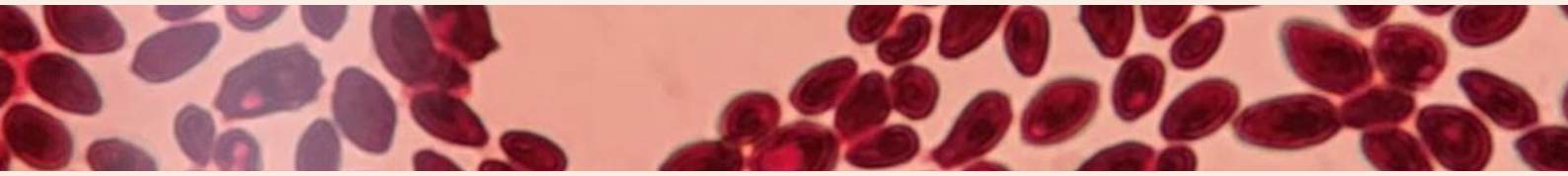


Tesis Doctoral

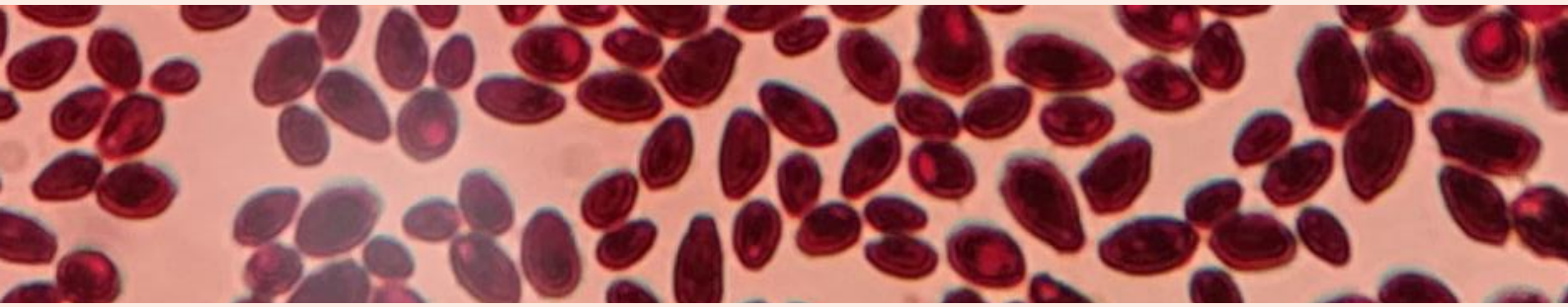


Valorización de subproductos de la industria alimentaria: obtención de etanol combustible y biomasa probiótica por fermentación con levaduras

Lic. María Dolores Pendón

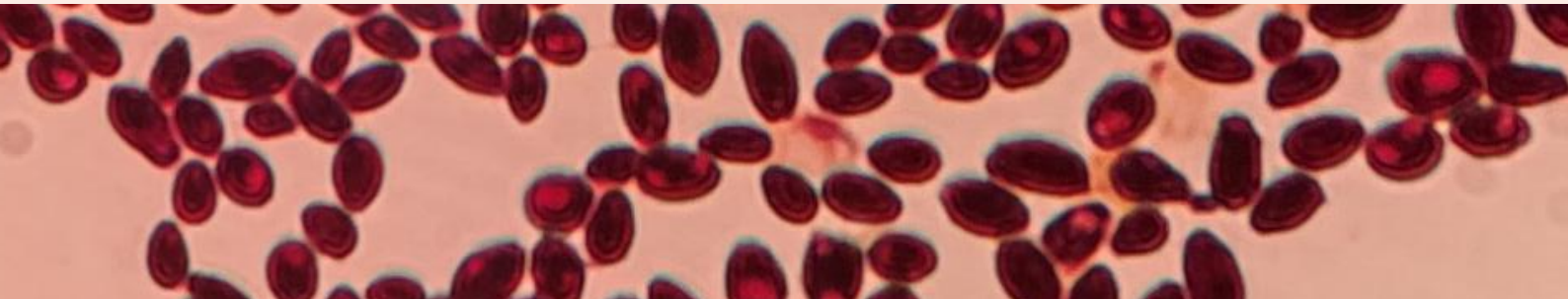
Directora : Dra. Graciela L. Garrote

Co- Director: Dr. Martín Rumbo



Universidad Nacional de La Plata | Facultad de Cs. Exactas | Departamento de Cs. Biológicas

2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

<u>Trabajo de Tesis Doctoral</u>:

Valorización de subproductos de la industria alimentaria: obtención de etanol combustible y biomasa probiótica por fermentación con levaduras

---

<u>Tesista</u>: Lic. María Dolores Pendón

<u>Directora</u>: Dra. Graciela L. Garrote

<u>Codirector</u>: Dr. Martín Rumbo

<u>Año</u>: 2024

CONICET

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

COMISIÓN DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

C I D C A

El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de alimentos (CIDCA), UNLP - CONICET- CIC.PBA; bajo la dirección de la Dra. Graciela L. Garrote y codirección de Dr. Martín Rumbo.

Los resultados del presente trabajo han sido publicados parcialmente en las siguientes instancias:

Publicaciones periódicas

- Pendón, M. D., Madeira, J. V., Romanin, D. E., Rumbo, M., Gombert, A. K., & Garrote, G. L. (2021). A biorefinery concept for the production of fuel ethanol, probiotic yeast, and whey protein from a by-product of the cheese industry. Applied Microbiology and Biotechnology, 105, 3859-3871.http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-021-11278-y
- Pendón M.D., Bengoa A.A., Iraporda C, Medrano M., Garrote G.L., Abraham A.G (2021) Water kefir: factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage. *Journal of Applied Microbiology*, 00:1–19. Wiley. ISSN:1364-5072 https://doi.org/10.1111/jam.15385
- Pendón, M. D., Garrote, G., & Rumbo, M. (2021). Valorización de subproductos de la industria alimentaria: obtención de etanol combustible y biomasa probiótica por fermentación con levaduras. *Investigación Joven*, 7(2), 260-261. Ed UNLP. ISSN: 2314-3991 https://revistas.unlp.edu.ar/InvJov/article/view/11563
- Pendón MD, Fages S., Ozaeta S., Rumbo M. Garrote G.L., Williams S. y Valette E. (2022). Estudio preliminar de la suplementación con la cepa *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 a cerdas gestantes y sus lechones, para el mejoramiento de los parámetros productivos. *Ergomix*, 6 Dic 2022, publicación técnica relacionada al evento: Jornadas de Actualización Porcina 2022. https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/estudio-preliminar-suplementacion-cepa-t51616.htm
- Pendón, M. D., Zapiola, J. M., Mañana, B., Rumbo, M., & Garrote, G. L. (2024). Obtention of pelleted Kluyveromyces marxianus CIDCA 9121 with immunomodulatory properties: Selection of protective agents using Plackett–Burman and Box–Behnken experimental designs. Food Bioscience, 60, 104284.

Resúmenes publicados en libros de Congresos

- Pendón M.D, Madeira Jr J.V., Rumbo M, Gombert A., Garrote G.L. *Kluyveromyces marxianus strain selection for co-production of fuel ethanol and viable biomass from cheese whey.* International Specialized Symposium on Yeasts, ISSY34. 1 al 4 de Octubre 2018.

- Romanin D.E., Bengoa A.A., Pendón M.D., Rumbo M., Garrote G.L. *Study of the probiotic properties of yeasts isolated from kefir.*. International Specialized Symposium on Yeasts, ISSY34. 1 al 4 de Octubre 2018.
- Pendón MD, Madeira Jr JV., Gombert A., Rumbo M., Garrote G.L.*Influencia del estrés en la actividad inmunomoduladora a nivel intestinal de Kluyveromyces marxianus.* XV Congreso Argentino de Microbiología (CAM) realizado del 25 al 27 de Septiembre DE 2019 en Buenos Aires, Argentina. Publicado en Libro de resúmenes ISBN 978-987-46701-5-1 pag 391.
- Pendón M.D., Rumbo M., Garrote G.L. *Valorización de subproductos de la industria alimentaria: obtención de etanol combustible y biomasa probiótica por fermentación con levaduras*. Encuentro de Becaries de Posgrado de la UNLP (EBEC) (Modalidad virtual, 12 de noviembre de 2020) https://congresos.unlp.edu.ar/ebec2020/becarie/maria-dolores-pendon/
- Pendón M.D; Bengoa A.A; Abraham A.G; Garrote G.L. *Suero y permeado de suero como matrices alimentarias alternativas para la obtención de una bebida fermentada por lactobacilos y levaduras con propiedades inmunomoduladoras* IX Congreso de Alimentos Siglo XXI: ALIMENTOS, NUTRICION Y SALUD. XLIII Reunión del Capitulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (CASLAN). I Jornada Patagónica de la Asociación de Nutricionistas del Chubut (ANCH) realizado del 13 al 15 de Octubre 2021, Argentina.
- Pendón, M.D.; Rumbo, M.; Garrote G.L. *Evaluación de diferentes métodos de conservación de levaduras para ser utilizadas como suplemento probiótico en alimentos funcionales.* VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CiCyTAC, realizado los días 4 al 6 de octubre 2022 en Córdoba, Argentina.
- Pendón MD, Fages S., Ozaeta S., Rumbo M. Garrote G.L., Williams S. y Valette E. *Estudio preliminar de la suplementación con la cepa Kluyveromyces marxianus CIDCA 9121 a cerdas gestantes y sus lechones, para el mejoramiento de los parámetros productivos.* XXI Jornadas de Actualización Porcina, realizadas el 3 y 4 de Noviembre 2022 en Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- M. D Pendón; M Rumbo; A G. Abraham; G L. Garrote Gránulos de kefir y kefir de agua como fuente de levaduras probióticas. 3er Congreso Latinoamericano de Ecología Microbiana, ISME-lat 2023, realizado del 7 al 10 de agosto 2023 en Bernal, Bs As, Argentina.

Mi agradecimiento:

A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, por brindarme la formación que me permitió la realización de este trabajo de Tesis y mis estudios de posgrado.

Al CONICET por otorgarme la beca que para poder llevar a cabo este trabajo.

A las autoridades del CIDCA por abrirme las puertas y permitirme desarrollar mi trabajo de tesis en este Centro de Investigación.

A mis Directores, Grace y Martin, sin quienes este trabajo de tesis no hubiese sido posible. Quiero agradecerles principalmente por haber confiado en mí, por haberme transmitido con calidez y paciencia infinidad de conocimientos y valores que me han nutrido en lo profesional y en los personal; por su dedicación y compromiso, por el cariño, y todos los momentos lindos compartidos a lo largo de este recorrido.

A las personas que forman el grupo de microbiología del CIDCA, por toda la ayuda brindada durante estos años de trabajo, por ser siempre amables y buenos compañeros, por soportar innumerables directivas de limpieza y orden y fundamentalmente, por hacer que los días de laboratorio sean más divertidos. A Meli, por acompañar con risas y caminar a la par. A Lucy, quien me recibió los primeros días de laboratorio y me dejó enseñanzas que conservare por siempre.

A mis compañeros de escritorio Silvana, Sandro y Javier.

A mi box, a Analía, por sus valioso aportes en el trabajo diario, por estar siempre accesible a una consulta o consejo, por levantarme el ánimo infinidad de veces con palabras de aliento y su positivismo único. A Agus, mi compañera y amiga, por sostener y acompañar, por todos los conocimientos transmitidos, revisiones, trabajos conjuntos, infinidad de mates, charlas motivacionales y risas compartidas. A Pablo, por prestarme su espacio y también su tiempo cuando fue necesario.

A los investigadores, técnicos, becarios y demás personal que trabaja en CIDCA por hacer que los días de trabajo sean un disfrute, por estar siempre disponibles para ayudar y compartir sus conocimientos.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Microbiología que acompañaron de cerca en este recorrido compartiendo mucho más que horas de docencia, en especial a Pablo, Tere, Jessi, Pato, Moni, Pity, Irma, Aye y Germán por todos los saberes compartidos y ser fuente de inspiración en lo profesional y en lo personal.

A las personas que trabajan en el IIFP que me han recibido para realizar diversos experimentos, poniendo a disposición sus saberes y espacio, en especial a Male y Juani por su calidez, predisposición y su participación en ensayos de animales. A Iva por todos los cultivos celulares que me preparó a contrareloj.

A las personas del CINDEFI que han hecho posible los ensayos en biorreactores, en especial a Tato por su participación central en el diseño y desarrollo de los experimentos de escalado, por transmitir con paciencia muchísimos conocimientos, por su predisposición a consultas en cualquier momento y revisión del capítulo 2. Y a Marina, por todo lo enseñado en estos ensayos siempre con una sonrisa.

Al grupo de personas de Laboratorio de Bioprocesos e Ingeniería Metabólica (LEMeB) / UNICAMP, con quienes compartí mi estadía en Brasil en los comienzos del doctorado y han

forjado una experiencia inolvidable en mi vida. En especial quiero agradecer a Andreas Gombert por todos los conocimientos transmitidos en los comienzos de este trabajo y también durante el recorrido posterior, y a Jose por ser un excelente compañero de trabajo en Brasil y en Argentina.

A Augusto Pich Otero y Javier por sus aportes en el análisis socioeconómico. A la empresa Agriglobal y su personal. A Matías Zapiola por su ayuda en el diseño y logística de los ensayos de extrusión y peletizado.

A las personas que colaboraron en el desempeño de trabajos con animales. A Eugenio Valette y a Sara Williams por su participación en los ensayos con cerdos, y a los alumnos de la Cátedra de Producción Porcina de la Facultad de Ciencias Veterinarias que colaboraron en esos ensayos. Al grupo de Granja 4B, que permitieron llevar a cabo el ensayo con cerdos en granja productiva. A los Dres. Mariano Fernández Miyakawa y Leandro Redondo por permitirnos trabajar en conjunto con el INTA- IPVet, en especial a Leandro por su participación en los ensayo con pollos.

A las personas de Beneficial Germs , en especial a Germán Cairó por abrirnos las puertas de su empresa, por poner a disposición los equipos para llevar a cabo la liofilización, por transmitir un punto de vista distinto de los procesos que llevamos a cabo en el laboratorio. También a Lucía y Sofía por su predisposición y compromiso.

A mis amigas, que estuvieron y están siempre cerca, celebrando los logros como propios y por ser red de contención, oído y abrazo cuando lo necesito.

A mi compañero de vida, Agustín, por ser refugio y sostén, por instruirme en valores y por acompañar con amor y alegría todos los progresos de mi vida. A Clau y Fabio por su enorme cariño.

A mi familia, a mi abuela Chochi, mis tías Marce y Patri, mis primos y Mauge por estar presente en cada paso que doy. A mis sobrinos por renovarme las energías con su amor.

A mi mamá Graciela, y mis hermanos Manu, Ampi y Santi por estar al lado mío siempre, por cuidar, acompañar y no dejarme bajar los brazos nunca.

A mi papá…siempre juntos.

"Nada se pierde,

Todo se transforma"

Jorge Drexler
inspirado en
Antoine Lavoisier

CAPÍTULO 1

Prueba de concepto: biorrefinería para la obtención de etanol combustible y biomasa probiótica a partir de subproductos de la industria alimentaria

CAPÍTULO 2

Optimización y escalado de la producción de biomasa de levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 a partir de permeado de lactosuero

CAPÍTULO 3

Estudio de métodos de conservación de biomasa de levadura con capacidad probiótica

CAPÍTULO 4

Evaluación de capacidad probiótica de levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 en animales de producción

INDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL

Subproductos de la Industria alimentaria 2
Melaza de caña de azúcar 3
Suero de quesería 4
Biorrefinerías 7
Levaduras y sus aplicaciones biotecnológicas 8
Kluyveromyces marxianus 9
Probióticos 10
Objetivos 14

CAPÍTULO 1: Prueba de concepto: biorrefinería para la obtención de etanol combustible y biomasa probiótica a partir de subproductos de la industria alimentaria

Introducción 16
Objetivos 20
Materiales y Métodos 21
1.1 Microorganismos y condiciones de cultivo 21
1.2 Ensayo de crecimiento en placa por diluciones seriadas 22
1.3 Sistema de fermentación industrial miniaturizado 23
1.3.1 Determinación de metabolitos extracelulares y parámetros fisiológicos 25
1.4 Ensayo de resistencia al pasaje gastrointestinal *in vitro* 26
1.5 Recuento de microorganismos viables en medio sólido 27
1.6 Recuento de microorganismos por técnica de la gota 27
1.7 Ensayo de caracterización de respuesta inmunomoduladora de inflamación intestinal en células Caco-2 ccl20:luc *in vitro* 28
1.8 Ensayos con animales de laboratorio 29
1.8.1 Animales utilizados y condiciones de alojamiento 29
1.8.2 Evaluación Inocuidad y Resistencia al pasaje gastrointestinal *in vivo* 30
1.8.3 Evaluación de translocación bacteriana 30
1.8.4 Evaluación de la capacidad moduladora de respuesta inflamatoria en un modelo murino de colitis inducido ácido 2,4,6-trinitrobencen-sulfónico (TNBS) 30
1.8.5 Histología y Score histopatológico 31
1.9 Ensayo de Autoagregación 32
1.10 Ensayo de Co-agregación de levadura con *Salmonella entérica* serovariedad Enteritidis 32
1.11 Ensayo de Adhesión a células de epitelio intestinal *in vitro* 33
1.12 Estudio del antagonismo frente asociación e invasión de Salmonella Enteritidis a células Caco-2/TC7 34
1.12 a- Efecto sobre los enterocitos pretratados con levadura 34
1.12 b- Efecto de la coincubación de *Salmonella* con la levadura antes de encontrar los enterocitos 34
1.12 c- Efecto de los metabolitos producidos por la levadura (sobrenadante libre de células) sobre *Salmonella* antes del contacto con las células epiteliales 35
1.13 Análisis estadístico 36
Resultados y Discusión 37
Selección de cepas de *Kluyveromyces marxianus* según su capacidad de crecer en diferentes medios industriales 37

Evaluación de producción de etanol de levaduras seleccionadas en sistema de fermentación industrial miniaturizado 45
Ensayo de caracterización de respuesta inmunomoduladora de inflamación intestinal en células Caco-2 ccl20: luc *in vitro* 50
Ensayo de Resistencia al pasaje gastrointestinal *in vitro* 52
Resistencia al pasaje gastrointestinal *in vivo* 54
Evaluación de la capacidad moduladora de respuesta inflamatoria en un modelo de colitis inducido por TNBS 55
Adhesión de levaduras a células de epitelio intestinal Caco 2/TC7 56
Capacidad de Autoagregación de levaduras y co-agregación con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CIDCA 101 58
Evaluación del efecto antagónico de levaduras sobre la asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis 60
Conclusiones 64

CAPÍTULO 2: Optimización y escalado de la producción de biomasa de levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 a partir de permeado de lactosuero
Introducción 66
Objetivos 68
Materiales y Métodos 69
2.1 Microorganismos 69
2.2 Determinación de parámetros de crecimiento 69
2.3 Efecto de la utilización de permeado de lactosuero en reemplazo de YPD para inóculo inicial 69
2.4 Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento 69
2.5 Efecto de la utilización de hidrolizado de levadura en reemplazo de extracto de levadura comercial sobre la producción de biomasa de *K. marxianus* CIDCA 9121 70
2.6 Cultivo a escala de Biorreactor de 5L 71
2.7 Cultivos a escala de Biorreactor de 15L 72
2.8 Determinaciones analíticas 73
2.9 Determinación de capacidad inmunomoduladora a nivel intestinal 74
2.10 Análisis estadístico 74
Resultados y Discusión 75
Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de biomasa de *K. marxianus* CIDCA 9121 77
Efecto de utilización de hidrolizado de levadura sobre la producción de biomasa de *K. marxianus* CIDCA 9121 80
Producción de biomasa de levadura en biorreactor de 5L 82
Producción de biomasa de levadura en biorreactor de 15 L 87
Conclusiones 90

CAPÍTULO 3: Estudio de métodos de conservación de biomasa de levadura con capacidad probiótica
Introducción 92
Objetivos 96
Materiales y Métodos 97
3.1 Obtención de biomasa húmeda 97
3.2 Ensayo de conservación a 4°C 97

3.3 Secado Spray 97
3.4 Extrusión 98
3.4.1 Selección de agente termoprotector 98
3.4.2. Extrusión en planta industrial 99
3.5 Liofilización 99
3.5.1 Selección de agente lioprotector 100
3.6 Determinación de actividad acuosa 100
3.7 Determinación de humedad porcentual 100
3.8 Capacidad inmunomoduladora de levadura deshidratada 101
Resultados y Discusión 102
Ensayo de criopreservación de *K. marxianus* CIDCA 9121 102
Evaluación de la deshidratación de *K. marxianus* CIDCA 9121 por secado spray 103
Estudio de factibilidad de la extrusión y peletizado de *K. marxianus* CIDCA 9121 106
Análisis de la obtención de *K. marxianus* CIDCA 9121 liofilizada 113
Selección de agentes lioprotectores 115
Liofilización en planta piloto 117
Conclusiones 121

CAPÍTULO 4: Evaluación de capacidad probiótica de levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 en animales de producción

Introducción 123
Objetivos 127
Materiales y Métodos 128
4.1 Estudio preliminar sobre la suplementación con la cepa *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 a cerdas gestantes y sus lechones: forma de administración, palatabilidad, inocuidad y resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal 128
4.2 Estudio de la suplementación con la cepa *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 liofilizada a cerdas gestantes, en lactancia y primera alimentación a lechones en granja productiva. 129
4.2.1 Determinación de IgA calostral 130
4.2.2 Determinación de IgG sérica en lechones 130
4.2.3 Determinación de anticuerpo anti-flagelina de *Salmonella* sp 131
4.2.4 Determinación de Citrulina sérica y aminoácidos nitrogenados en sangre de lechones 131
4.3 Estudio de la suplementación temprana con la cepa *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 a pollos parrilleros 132
Resultados y Discusión 134
Estudio preliminar sobre la suplementación con la cepa *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 a cerdas gestantes y sus lechones: forma de administración, palatabilidad, inocuidad y resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal 134
Estudio de la suplementación con la cepa *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 liofilizada a cerdas gestantes, en lactancia y primera alimentación a lechones en granja productiva 140
Estudio la suplementación temprana con la cepa *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 a pollos parrilleros 149
Conclusiones 157

CONCLUSIONES GENERALES 160

Conclusión y perspectivas 167
ANEXO 169
1. Medios de cultivo 169
2. Reactivo de Antrona 174
3. Cultivo de células Caco-2/TC7 174
4. Medios utilizados en cultivos celulares 175
5. Preparación y tinción de cortes histológicos con Hematoxilina y Eosina 175
BIBLIOGRAFÍA 177

INTRODUCCIÓN GENERAL

Subproductos de la Industria alimentaria

La implementación de conceptos como economía circular y bioeconomía en Argentina y en varias partes del mundo refleja un cambio de paradigma en los modelos de producción y consumo. Durante mucho tiempo, el enfoque predominante fue el de una economía lineal, que implicaba adquirir, utilizar y desechar los materiales sin considerar plenamente su impacto ambiental ni la posibilidad de reutilización. La economía circular busca precisamente cambiar este modelo lineal hacia uno más sostenible y eficiente, donde los productos, partes y recursos se mantengan en uso durante el mayor tiempo posible, se promueva la reutilización y el reciclaje, y se minimice el desperdicio. Este enfoque no solo tiene beneficios ambientales al reducir la contaminación y la generación de residuos, sino que también puede generar desarrollo económico y bienestar social de manera más equitativa y sostenible (Preciado-Saldaña et al., 2022).

La definición recientemente ajustada en la Cumbre Mundial de Bioeconomía (Global Bioeconomy Summit 2018) establece que: "la bioeconomía es la producción, utilización y conservación de recursos biológicos, incluido el conocimiento relacionado, la ciencia, la tecnología y la innovación, para suministrar información, productos, procesos y servicios en todos los sectores económicos, en busca de una economía sostenible" (Nelson & Grayson, 2017).

Las interacciones biomasa/conocimientos/innovación, así como la "circularidad" ambiental implícita, permiten presentar la bioeconomía como un instrumento importante para hacer frente a los desafíos interrelacionados de seguridad alimentaria, agotamiento de recursos y cambio climático que hoy se plantean y que, al mismo tiempo, posibilitan un crecimiento económico sostenible a través nuevas actividades y cadenas de valor basadas en bioproductos (Trigo et al., 2015).

Entre las distintas áreas de desarrollo de nuevos procesos que acerquen los esquemas productivos tradicionales a la economía circular, la producción de alimentos es una de las áreas en la que se pueden encontrar múltiples posibilidades, tanto desde el lado del desarrollo de bioinsumos que permitan mejorar los procesos productivos, así como en la valorización de subproductos a partir de sofisticación de procedimientos. La transformación de subproductos de la industria alimentaria en compuestos de mayor valor agregado presenta un desafío importante tanto para los sectores productivos como científicos y tecnológicos. Estos subproductos pueden ser una buena fuente de compuestos bioactivos. En este trabajo de Tesis se exploran nuevas alternativas para valorizar dos importantes subproductos como lo son la melaza y el lactosuero, generados en dos procesos productivos que por su magnitud e impacto en economías regionales son de importancia económica para nuestro país.

Melaza de caña de azúcar

La **melaza,** el efluente final obtenido en la producción de azúcar mediante cristalización repetida, es uno de los desechos y principal subproducto de la industria azucarera y contiene cerca de 50-55% de azúcar fermentable (Kopsahelis et al., 2012), principalmente sacarosa (32%), fructosa (16%) y glucosa (14%), por lo cual es considerado como un sustrato rico en carbohidratos (Figura I). Además, tiene como características principales: alta disponibilidad y bajo costo (Contreras et al., 2022). El elevado contenido de nutrientes hace que este efluente sea sumamente contaminante, con una alta demanda bioquímica (DBO) y química (DQO) de oxígeno.

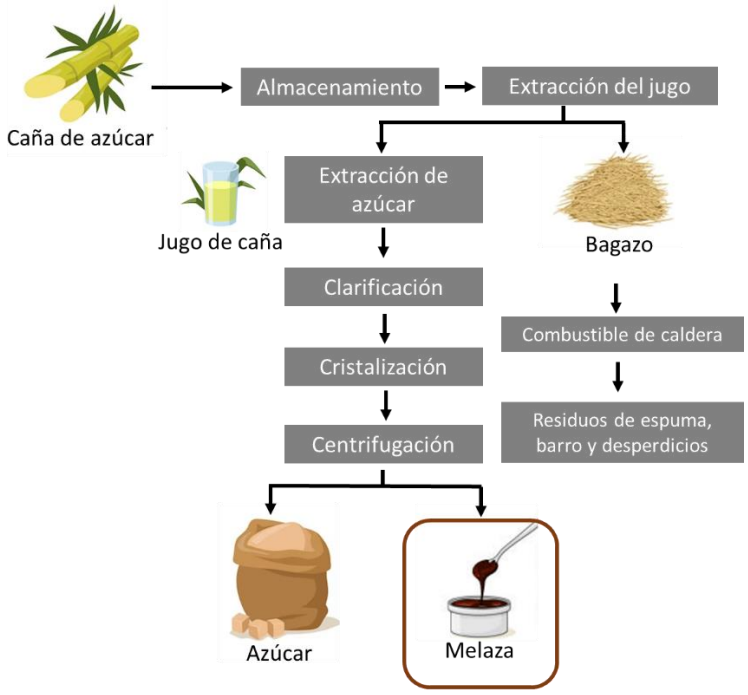


Figura I: Proceso general de producción de azúcar y melaza.

La producción mundial de caña de azúcar se encuentra concentrada principalmente en los países de Brasil, India y China. En Brasil, el 52% del procesamiento de caña se utiliza para obtener azúcar y el resto en la producción de bioetanol, una opción sustituta a los combustibles fósiles (Bordonal et al., 2018). En nuestro país, la producción de azúcar se concentra en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy y, en menor medida, en Misiones y Santa Fe. Según el Censo Nacional Agropecuario (CNA) de 2018, Tucumán cuenta con 2.038 explotaciones cañeras mientras que en Jujuy se registraron 76 y en Salta 26 explotaciones. En los últimos años la producción de azúcar en Argentina se incrementó notablemente, estabilizándose en algo más de 2 millones de t/año. Simultáneamente, el mercado

internacional se presenta con buenas oportunidades, por lo que Argentina tiende a convertirse en un exportador permanente de azúcar, con una base de 600.000 t/año (Potes & Silva, 2022). La melaza tiene una multitud de usos como la producción de bioetanol, biogas, biometano, butanol, acido succínico y biopolímeros, entre otros (Vandenberghe et al., 2022). También se ha descripto su utilización como ingrediente principal de las dietas de pollos y cerdos, llegando a componer hasta el 40% de la ración proporcionada (Lauric et al., 2021).

Aun así, estos usos no resuelven la problemática de los grandes volúmenes de melaza producidos a diario por la industria azucarera y es necesario continuar buscando alternativas para su revalorización a través de procesos que requieran bajo costo y sean amigables con el ecosistema.

Suero de quesería

El **suero,** es un líquido de color verdoso amarillento y turbio que resulta de la elaboración de quesos y que contiene parte de las proteínas solubles, así como la mayor proporción de la lactosa presente en la leche cruda (Figura II). Según la técnica utilizada para eliminar la caseína de la leche, el suero del queso se puede clasificar en suero dulce o ácido. El suero dulce (pH alrededor de 5,6) se obtiene a partir de una mezcla de un complejo enzimático industrial o cuajo (que contiene la proteasa quimosina), que conduce a la coagulación de la caseína. El suero ácido (pH = 4,5) resulta de la precipitación de la caseína, utilizando una mezcla de ácidos orgánicos (ácido láctico) y minerales (ácido clorhídrico o sulfúrico), o con la acción de bacterias específicas (Carvalho et al., 2021). Estos dos tipos de suero presentan diferencias en el contenido de minerales, acidez y volumen de proteínas (Tabla I).

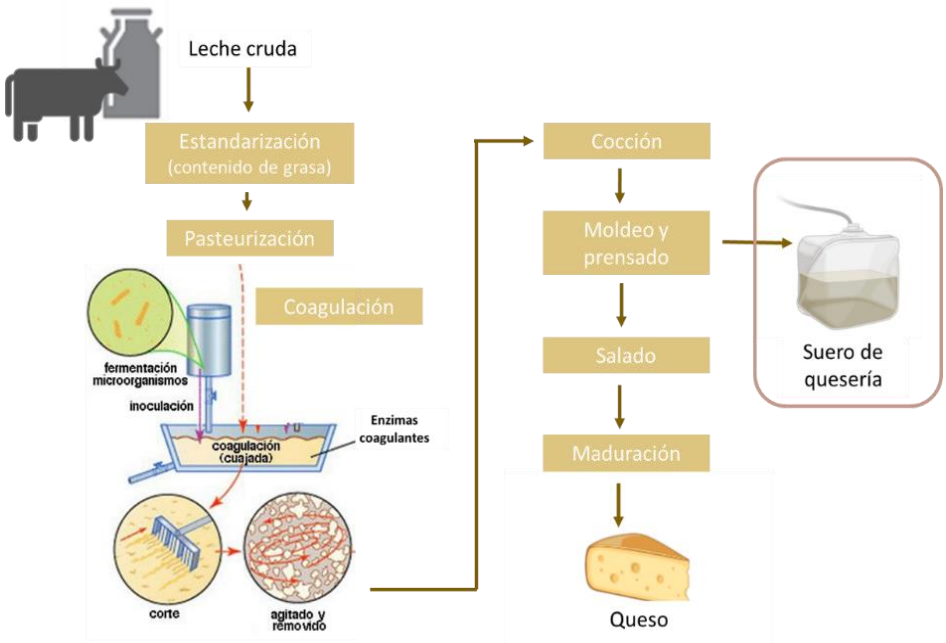


Figura II: Proceso de obtención de queso y suero de quesería.

Entre los componentes nutricionales más abundantes en el suero se encuentran: lactosa (45 - 50 g/l), proteínas solubles (6 - 8 g/l), lípidos (0,3-0,5 g/l) y sales minerales (4 - 6 g/l) (Juliano et al., 2017). Además, en su composición contiene proteínas de alto valor biológico como la β-lactoglobulina, α-lactoalbúmina, lactoferrina, lactoperoxidasa, entre otras. En cuanto al contenido de vitaminas, el suero presenta cantidades pequeñas pero apreciables de las vitaminas A, C, D, E y del complejo B, el cual es fundamental para la absorción de minerales, tales como el calcio y el fósforo (Poveda, 2013).

Tabla I: Composición de tipos de suero. *Adaptado de* Deshmukh et al., (2024)

Tipo de Suero		
	Lactosuero dulce (g/L)	**Lactosuero ácido (g/L)**
Coagulación	Enzimática	Mixta o ácida
Sólidos totales	63,0 - 70,0	63,0 - 70,0
Lactosa	38,0 - 52,0	40,0 - 47,0
Proteína	5,6 - 10,0	4,5 - 8,0
Grasa	0,2 – 0,5	0,18-0,3
Calcio	0,4 - 0,6	1,2 - 8
Sodio	0,4	0,5
Magnesio	0,07	0,12
Fosfatos	1,0 - 3,0	2,0 - 4,5
Lactato	0,7 - 2	6,4
Cloruros	0,8 - 1,1	1,1 - 1,5
pH	5,8 - 6,4	4,5 - 5,2

Una de las alternativas más conocida hoy en día para el aprovechamiento de suero es su utilización para la obtención de concentrados proteicos (WPC) que contienen 35-80% de proteína, o bien con una posterior purificación, puede obtenerse lo que se conoce como aislado proteico (WPI) con un 90 % de la proteína presente en el suero. Aun así, estos procesos generan como producto secundario el **permeado de suero**, en cuya composición se encuentra el 70% de los sólidos y el total de la lactosa presente en el suero inicial. Según el Código Alimentario Argentino (CAA) el permeado suero se obtiene extrayendo por filtración con membranas, la materia grasa y las proteínas lácteas, pero no la lactosa de la leche, del suero, la crema y/o el suero de manteca y/u otras materias primas lácteas como el queso. La lactosa remanente en el permeado aún puede ser recuperada y utilizada para su incorporación en las fórmulas para bebés, como excipiente en la industria farmacéutica y también para producir derivados con adición de lactosa, como lactulosa, lactitol, ácido lactobiónico, lactosil urea, galactooligosacáridos y lactosacarosa o bien ser utilizada para la producción de etanol por fermentación con levaduras (Guimarães et al., 2010; Sharma et al., 2018; Álvarez-Cao et al., 2020;). Alternativamente, la lactosa puede hidrolizarse para originar una mezcla de glucosa y galactosa en productos lácteos sin lactosa o puede usarse como edulcorante alimentario (Gänzle et al., 2008).

Se estima que por cada kilo de queso producido se generan 9 litros de suero. Brasil, Argentina, Chile y Uruguay son los principales países elaboradores de queso de Sudamérica. Brasil procesa cerca de 36.508 millones de litros de leche al año de los cuales 22% se destina a la producción de queso, con un volumen de 6.800 millones de litros de suero por año. En Argentina, se procesan 11.553 millones de litros de leche anuales, pero aquí el 44% se destina a la industria quesera y, por ende, un total de 4.908 millones de litros de suero son producidos al año. De estos, se estima que el 55% es destinado a la alimentación animal o directamente vertido al ambiente sin pretratamiento (Talamoni et al., 2023), representando un daño ambiental significativo y una pérdida de la posibilidad de darle mayor valor agregado.

En la última década, Argentina ha experimentado un notable aumento en la utilización del suero de quesería acompañando la evolución en su cadena productiva, pasando de ser considerado simplemente un "alimento para animales" a ser parte integral de la industria alimentaria (Talamoni et al., 2023). La tecnología ha permitido la incorporación del suero como ingrediente alimenticio en una amplia variedad de productos como fórmulas infantiles, panificados, lácteos, bebidas, snacks, postres, productos de confitería y helados, entre otros. Es importante resaltar que los diferentes derivados del lactosuero requieren distintos niveles de procesamiento, lo que implica la necesidad

de contar con equipamiento específico, procesos tecnológicos adecuados y conocimientos especializados.

Las grandes empresas lácteas argentinas procesan más de 250.000 litros de leche a diario, obteniendo arriba de 50.000 litros diarios de suero y lo comercializan como producto seco pre-concentrado, concentrados proteicos o como lactosa. Sin embargo, alrededor del 89% de las empresas lácteas en nuestro país procesan menos de 50.000 litros diarios de leche y no generan un volumen de suero suficiente para producir ingredientes de suero por sí solas. Además, suelen estar localizadas a grandes distancias de las plantas procesadoras, con deficientes o nulas tecnologías de pretratamiento (Figura III).

La necesidad de valorizar el lactosuero ha sido identificada por el Instituto Nacional de Tecnología Industrial, INTI, como una de las prioridades de la industria láctea (Juliano et al., 2017), a tal punto que es una de las demandas identificadas por el sector productivo y planteadas al sistema científico.

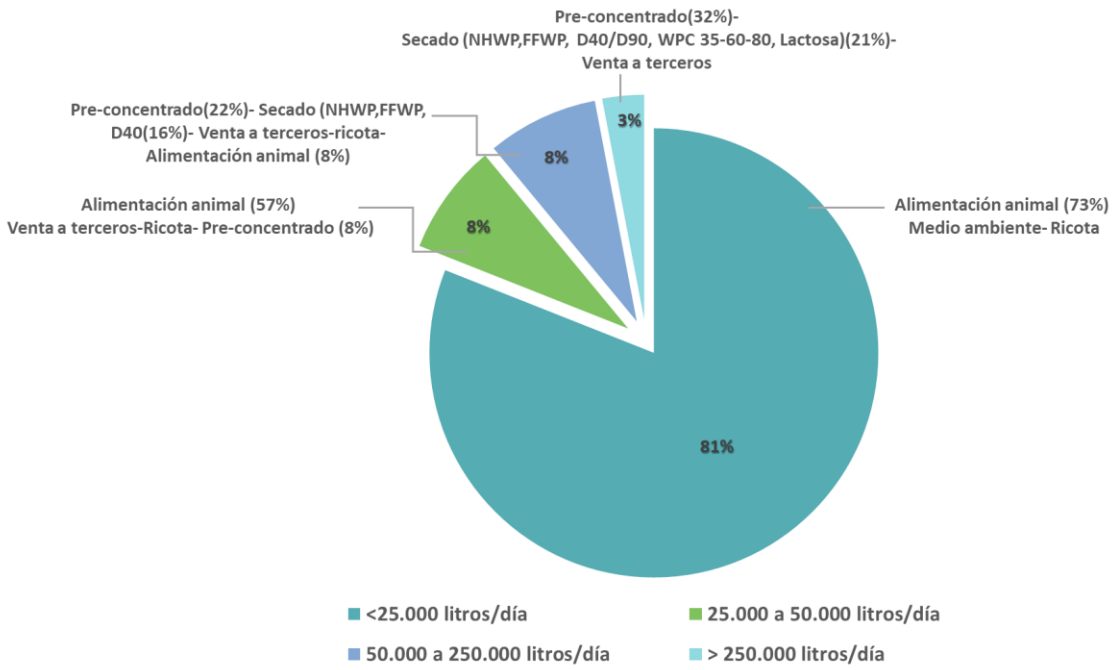


Figura III: Porcentaje de empresas lácteas clasificadas en función del volumen de leche procesado por día y los principales destinos del lactosuero en cada una de ellas. *Adaptado de Talamoni et al., 2023.*

Biorrefinerías

El crecimiento de la urbanización y la población mundial ha incrementado el consumo de energía basada en combustibles fósiles, así como la demanda de materias primas de origen biológico, lo que

a su vez ha generado una mayor producción de residuos antropogénicos con un impacto significativo sobre el medio ambiente. En este contexto, la producción de bioenergía y biomateriales emerge como un nuevo paradigma industrial con potencial para satisfacer esta demanda. Es así, que las biorrefinerías se presentan como una alternativa de invención tecnológica y sostenible para transformar diferentes tipos de residuos agroindustriales y urbanos, valorados negativamente, en productos comercializables de mayor valor agregado (Rivera et al., 2019).

Una biorrefinería puede definirse como una entidad que emplea una o varias fuentes de biomasa y/o residuos para la generación de diversos materiales, productos y formas de energía mediante la combinación de diferentes procesos biológicos como la fermentación, digestión anaeróbica, procesos enzimáticos, procesos fisicoquímicos, extracciones mecánicas y/o destilación, entre otros (Carrillo & Ponce- Sanchez, 2019).

A lo largo del último siglo, gran parte de nuestro progreso económico se ha basado en los combustibles fósiles (carbón, petróleo y gas) y en los productos químicos fabricados por el ser humano. Esto ha conducido a una extracción, consumo y desecho no sostenible de los recursos naturales, acelerando el proceso de cambio climático, la pérdida de biodiversidad y la degradación del medio ambiente, perjudicando la salud humana y debilitando el desarrollo a largo plazo. La bioeconomía pretende romper con este sistema y las biorrefinerías productoras de etanol combustible aparecieron como una alternativa de gran potencia para disminuir esta problemática, ya que el etanol producido puede tener un uso farmacéutico o ser empleado como mezcla combustible sustituyendo a las naftas con ventajas con respecto a las emisiones de $C0_2$ y siendo un recurso renovable.

Levaduras y sus aplicaciones biotecnológicas

Las levaduras son microorganismos eucariotas que viven en una amplia variedad de entornos: agua, suelo, aire, superficie de plantas, frutas y productos fermentados. Estos microorganismos han sido empleados por el hombre desde hace miles de años para realizar biotransformaciones de utilidad en la elaboración de distintos productos alimenticios.

Las levaduras poseen una serie de características fenotípicas ventajosas para múltiples aplicaciones como una elevada capacidad de secreción, una rápida tasa de crecimiento en una amplia gama de fuentes de carbono, la habilidad para compartimentar reacciones en orgánulos, la capacidad de realizar diversas modificaciones postraduccionales en proteínas, facilidad para su cultivo tanto en pequeños volúmenes como en biorreactores de gran escala, sencilla purificación del producto y

ausencia de susceptibilidad a agentes infecciosos como los bacteriófagos lo que garantiza una mayor estabilidad en los procesos de producción (Wagner & Alper, 2016).

Desde una perspectiva tecnológica, las levaduras se clasifican en dos grupos principales: *Saccharomyces* (fermentadoras de sacarosa) y no-*Saccharomyces* (no fermentadoras de sacarosa). *S. cerevisiae* es la especie más estudiada y la más utilizada en la fermentación de vinos y cervezas debido a su capacidad fermentativa satisfactoria, rápido crecimiento y fácil adaptación (Querol et al., 2006). Entre las levaduras no-*Saccharomyces* más estudiadas se incluyen distintas especies de los géneros *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora, Brettanomyces*, *Pichia, Lanchacea* y *Kluyveromyces*, entre otras.

Las levaduras desempeñan una variedad de funciones fundamentales durante la fermentación de alimentos, abarcando desde la producción de alcohol hasta la generación y utilización de ácidos orgánicos, mejorando así el sabor, aroma y textura de los productos. Además, contribuyen a enriquecer las propiedades nutricionales y a reducir la presencia de toxinas y factores antinutricionales. En la industria alimentaria, las levaduras son clave en la producción de alimentos funcionales, ya que pueden actuar como microorganismos probióticos, aportar constituyentes de la pared celular (como el β-glucano) con propiedades prebióticas o aportar metabolitos bioactivos. Asimismo, muchas levaduras son capaces de producir enzimas específicas que facilitan la biotransformación de metabolitos alimenticios, generando así nutracéuticos de alto valor. Recientemente, la ingeniería metabólica se ha empleado para desarrollar cepas de levadura más eficientes en la producción de oligosacáridos y compuestos bioactivos como carotenoides, polifenoles y folatos (Rai et al., 2019). Numerosos trabajos citan la utilización de levaduras en la síntesis biológica de anticoagulantes, hormonas de crecimiento y análogos de insulina en la industria farmacéutica y diferentes enzimas como quimosina, fitasa, hexosas oxidasa y triacilglicerol lipasas de interés como aditivos alimentarios (Wagner & Alper, 2016).

Kluyveromyces marxianus

Kluyveromyces marxianus fue descrita por primera vez en 1888 por E.C. Hansen y en ese momento se nombró *Saccharomyces marxianus* en honor a Marx, la persona que originalmente aisló esta levadura de las uvas (Lodder y Kreger-van Rij 1952). Desde un principio, la formación de pseudomicelio y la capacidad de asimilación y fermentación de la lactosa fueron las principales características que la diferenciaron del verdadero género *Saccharomyces*. Además, la mayoría de las cepas presentan efecto Cabtree negativo lo que les proporciona altas tasas de conversión de sustrato en biomasa en condiciones aeróbicas (Fonseca, 2022). Si bien estas dos características son

compartidas con la especie *Kluyveromyces lactis,* el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas con *K. marxianus* presenta ventajas respecto a *K. lactis* debido a que puede crecer en una mayor variedad de sustratos y con alta tasa de crecimiento a temperaturas superiores (Fonseca et al., 2008). Otro aspecto interesante es que se han aislado cepas de *K. marxianus* de hábitats muy diversos tales como leches fermentadas, yogures, quesos, kefir, aguas residuales de ingenios azucareros y plantas de sisal (*Agave sisalana*) (Lodder y Kreger-van Rij 1952), un fiel reflejo de su capacidad de crecer a partir de diferentes sustratos.

A lo largo de los años, se han explorado diversas aplicaciones de *K. marxianus* en la industria farmacéutica y alimentaria, que incluyen la producción de una amplia gama de enzimas como inulinasa y la β-galactosidasa, proteínas heterólogas, compuestos aromáticos y bioingredientes, así como la reducción del contenido de lactosa en alimentos, la producción de bioetanol o proteínas, y la biorremediación (Fonseca et al., 2008). Además, su capacidad para producir etanol de manera eficiente y su termotolerancia han impulsado el desarrollo de la fermentación a alta temperatura que previene la contaminación microbiana y reduce los costos de refrigeración (Nurcholis et al., 2019).

Probióticos

Las levaduras, así como las bacterias ácido-lácticas, se han utilizado desde tiempos remotos para la conservación de alimentos y más recientemente, por su rol en el desarrollo de alimentos funcionales. La especie humana se ha beneficiado de los microorganismos presentes en los alimentos y bebidas de diversas formas a lo largo de la historia. Hipócrates, ya en el año 76 A. C se refería a los beneficios de los alimentos fermentados al decir “que el alimento sea tu mejor medicina y que tu mejor medicina sea el alimento”. Plinio, en el año 77 D. C., describió que la administración leche fermentada era un buen remedio para tratar la gastroenteritis. A comienzos del Siglo XX, Metchnikoff observó que habitantes de los Montes Balcanes que consumían gran cantidad de lácteos fermentados eran muy longevos y lo atribuyó a la presencia de lactobacilos en estos alimentos. El primer uso del término “Probiótico” se atribuye a Vergio, quien en 1954 se refirió a los efectos negativos que los antibióticos causaban en la microbiota intestinal y decidió que lo que influyera positivamente sobre la microbiota intestinal, se llamaría “probiótico” (*del griego “pro” a favor y “bios” vida*). En 1989, Fuller definió a los probióticos como “un suplemento dietético a base de microbios vivos que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal”. En la última década, ante los avances en investigación, la Organización Mundial de la Salud (OMS) buscó un consenso y fue así como la Asociación Científica Internacional de Probióticos

y Prebióticos (ISAPP), definió a los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped” (Hill et al., 2014).

Según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), un alimento probiótico debe contener un mínimo de 10^6 UFC/g de organismos activos y vivos en el momento de su consumo (Joint, 2002), aunque debería considerarse en cada caso particular la dosis en que el probiótico resulta efectivo. La mayoría de los probióticos disponibles en el mercado para consumo humano son bacterias lácticas y bifidobacterias. Otras especies bacterianas relevantes comúnmente utilizadas como probióticos son *Bacillus* spp, *Enterococcus* spp, *Escherichia coli* y *Weissella* spp (Singh et al., 2022). Existe un interés constante en la búsqueda de nuevas cepas de microorganismos probióticos y, dentro de ellas, las levaduras constituyen una alternativa atractiva que aún no ha sido explorada extensamente. El uso de microorganismos probióticos eucariotas, como las levaduras, puede ofrecer interesantes ventajas ya que, en primer lugar, las levaduras suelen ser menos susceptibles a los antibióticos comúnmente administrados para tratar infecciones por bacterianas entéricas. A diferencia de las bacterias, las levaduras no transmiten genes de resistencia a los antibióticos y salvo excepciones, la translocación no ha sido reportada (Sen y Mansell, 2020). Además, las levaduras tienen la capacidad de reducir la adherencia de patógenos a las superficies mucosas y se ha sugerido que desempeñan un papel positivo en enfermedades causadas por un cambio en la microbiota intestinal sana, como las enfermedades inflamatorias intestinales o las diarreas causadas por microorganismos oportunistas asociadas a antibioticoterapia (Ianiro et al., 2014).

Es importante asimismo destacar que, en la producción industrial de probióticos, es crucial garantizar su estabilidad tanto en términos de viabilidad como de actividad a lo largo de su vida útil y las levaduras, en general, exhiben una mayor resistencia a los cambios ambientales abruptos tales como variaciones en el pH y cambios osmóticos, en comparación con otros microorganismos probióticos como las bacterias lácticas, por ejemplo. También tienen menores requerimientos nutricionales, lo que puede resultar en una reducción de costos en los procesos de producción. Por otro lado, la mayor tolerancia de las levaduras al ácido en comparación con las bacterias puede ser una ventaja significativa, tanto durante la fermentación minimizando el riesgo de contaminación bacteriana, como también durante el almacenamiento y consumo de los productos probióticos (Pang et al., 2022).

Entre las levaduras probióticas encontramos al género *Saccharomyces* como el más ampliamente estudiado, con *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* o *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS 5926 como la levadura probiótica modelo. Esta levadura ya lleva más de 30 años en el mercado y se ha utilizado para tratar diferentes tipos de diarreas virales y bacterianas, y enfermedades crónicas a nivel intestinal tanto en animales como en humanos (Kelesidis & Pothoulakis, 2012). Se ha demostrado que *S. boulardii* es capaz de unirse y neutralizar bacterias entéricas patógenas (*C. difficile, Escherichia coli, Vibrio cholera, Salmonella y Shigella spp*.) y sus toxinas, de ejercer efectos inmunomoduladores induciendo la secreción de IgA, factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleuquina (IL)-1β, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-12 o reduciendo los niveles de citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF-α en modelos de colitis e infección por *E. coli* patógena (Palma et al., 2015).

Kluyveromyces marxianus, se presenta como una especie no-*Saccharomyce*s con características prometedoras para su utilización como probiótico, incluyendo la tolerancia al ácido y las sales biliares, la supervivencia al paso a través del tracto gastrointestinal ,la capacidad inmunomoduladora y protectora frente al estrés oxidativo (Romanin et al., 2010; Diosma et al., 2013; Smith et al., 2015; Romanin et al., 2016). Otros estudios han demostrado la producción de péptidos inhibidores de enzima convertidora de angiotensina, capacidad de inducción de apoptosis en diferentes células cancerosas humanas, la capacidad de adhesión a epitelio gastrointestinal, reducción de niveles séricos de triglicéridos y colesterol en ratones con hipercolesterolemia (Macaferri et al., 2012; Li et al., 2015; Xie et al., 2015; Saber et al., 2017).

Esta capacidad dual de la levadura *K. marxianus* de poseer excelentes cualidades para aplicación biotecnológica a gran escala fermentando diferentes sustratos y, además, su emergente caracterización como microorganismo probiótico, nos permitieron plantear el desarrollo de una biorrefinería destinada a la obtención de bioetanol y biomasa probiótica a partir de la fermentación de subproductos de la industria alimentaria tales como son la melaza de caña de azúcar y el suero de quesería.

Al inicio de esta introducción hemos abordado la problemática asociada a los subproductos de la industria azucarera y quesera, y también hemos explorado las alternativas tecnológicas disponibles en la actualidad. No obstante, los considerables volúmenes de melaza y lactosuero generados diariamente en nuestro país continúan impulsando la necesidad de encontrar soluciones que mitiguen el impacto ambiental de su eliminación como residuos. Se busca generar otros bioproductos que puedan satisfacer una demanda equivalente al volumen de subproducto que se

pretende tratar. En este sentido, tanto la producción de bioetanol como la de probióticos para consumo humano o animal ofrecen la posibilidad de generar bioproductos con una demanda potencial que podría absorber la totalidad de los desechos industriales a tratar. Sin embargo, un factor importante a considerar es que el crecimiento en diferentes sustratos y condiciones podrían afectar la capacidad probiótica de los microorganismos (Foligne et al., 2016), así como también la producción de etanol (Bellaver et al., 2004; Fonseca et al., 2007; Basso et al., 2008, Della-Bianca & Gombert, 2013). En particular, las condiciones de fermentación para producir bioetanol implican un estrés para la biomasa final que podría alterar sus propiedades funcionales. En consecuencia, uno de los desafíos a afrontar en este trabajo de tesis fue evaluar cuidadosamente el efecto del sustrato y las condiciones de fermentación para determinar qué combinaciones particulares levadura-sustrato-condiciones de fermentación, permiten la producción simultánea de bioetanol y biomasa de levadura a ser utilizada como probiótica.

OBJETIVOS

Considerando el interés mundial y en particular en nuestra región por el desarrollo de fuentes de energía renovables para incrementar el parque energético, la búsqueda de alternativas que permitan incrementar el rendimiento económico del proceso de producción de bioetanol con la generación de biomasa con potencial uso como probiótico para mejorar la salud humana y/o veterinaria es sin duda de gran impacto. Como **objetivo general** del presente trabajo de Tesis se pretende evaluar el potencial de un concepto dual de biorrefinería para la obtención de probióticos y etanol combustible empleando levaduras y subproductos de la industria alimentaria como sustrato para la fermentación.

Para ello, se propusieron como **objetivos específicos** los detallados a continuación:

- Evaluar la capacidad de levaduras del género *Kluyveromyces* de desarrollar y producir etanol en lactosuero y melaza de caña.
- Estudiar las características probióticas de las levaduras crecidas en los distintos sustratos, focalizando en la actividad antiinflamatoria del tracto gastrointestinal y antagonismo contra patógenos.
- Optimizar y escalar la producción de biomasa de la/las cepas seleccionadas.
- Estudiar diferentes métodos de conservación de la biomasa de levadura con capacidad probiótica.
- Evaluar los beneficios sobre la salud y parámetros productivos al administrar la levadura obtenida a animales de producción.

1

Prueba de concepto: biorrefinería para la obtención de etanol combustible y biomasa probiótica a partir de subproductos de la industria alimentaria

INTRODUCCIÓN

La escasez de energía a nivel global y la urgente necesidad de transitar hacia fuentes de energía renovable han generado un creciente interés en las biorrefinerías como una alternativa. Estos procesos utilizan como insumo biomasa proveniente de diversas fuentes, incluyendo deshechos agrícolas, forestales y urbanos, y utilizan distintas tecnologías para producir compuestos químicos, biocombustibles, alimentos e ingredientes para piensos, biomateriales y energía a partir de los mismos. Dentro de este espectro, la producción de etanol combustible se destaca dado que puede ser empleado tanto en aplicaciones farmacéuticas como en la industria de combustibles como un sustituto de las naftas convencionales. Aunque tradicionalmente se ha recurrido a *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación de etanol, se han propuesto otras levaduras y bacterias como alternativas viables (Radecka et al., 2015). El rendimiento en etanol se presenta como el parámetro de proceso más crucial y está influenciado por diversos factores, incluyendo el sustrato de fermentación, la cepa de levadura y las condiciones específicas de fermentación, como la temperatura y la agitación, entre otros.

Como se ha mencionado anteriormente, *Kluyveromyces marxianus* presenta características tales como alta tasa de crecimiento, metabolización de diversos sustratos (azúcares C5, C6 y C12) y tolerancia a altas temperaturas, toxinas y pH, que la presentan como microorganismo prometedor para su uso en biorrefinerías no asépticas (Ha-Trand et al., 2020). Uno de los aspectos más atractivos de *Kluyveromyces* sp. es su capacidad de metabolizar la lactosa (Figura 1.1), capacidad que involucra dos proteínas: la lactosa permeasa (codificada por el gen LAC12) y una B-galactosidasa (codificada por el gen LAC4).

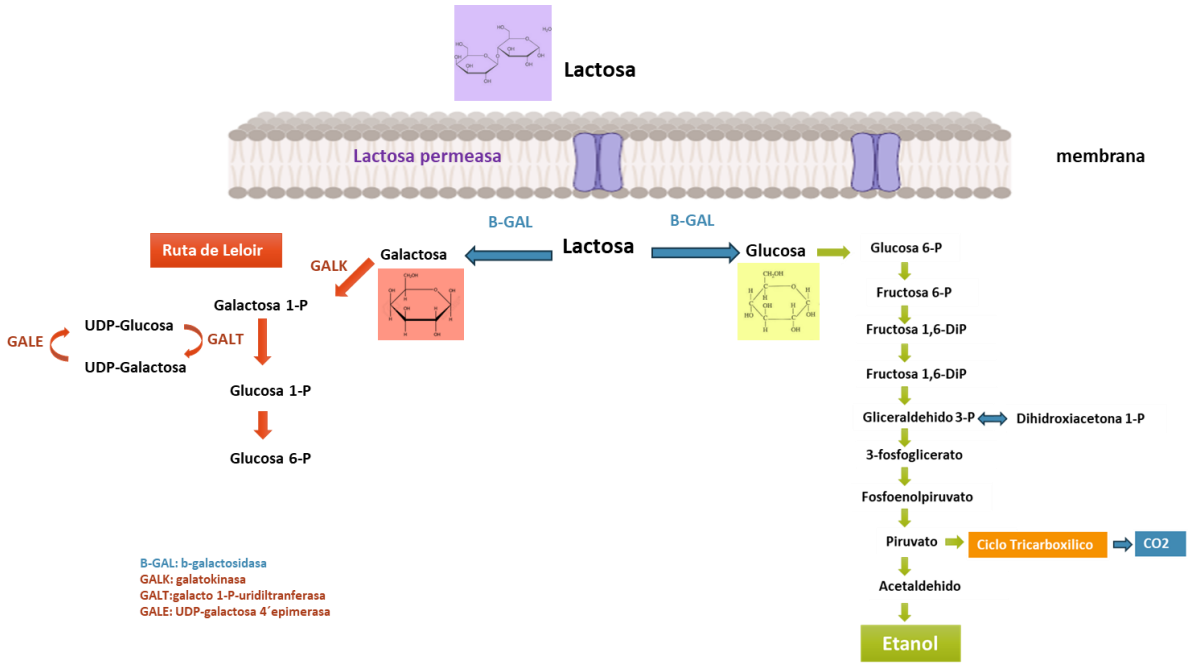


Figura 1.1: Ilustración esquemática de la vía catabólica de lactosa y producción de etanol por *K. marxianus. Adaptado de* Bilal et al., 2022.

Por otro lado, la especie *K. marxianus* presenta propiedades que la muestran como una levadura potencialmente probiótica (Homayouni-Rad, et al., 2020). Esto añade un valor adicional para su uso en biorrefinerías, ya que el excedente de biomasa obtenido podría ser comercializado como probiótico. Este enfoque ya ha sido propuesto con éxito para las bacterias lácticas como una forma de generar valor agregado a la biomasa (Mazzoli et al., 2014), pero es nuevo para el caso de las levaduras.

Los mecanismos mediante los cuales los probióticos ejercen su efecto son muy diversos y pueden implicar la modificación del pH del intestino, antagonizar frente a los agentes patógenos a través de la producción de compuestos antimicrobianos, competir por los nutrientes disponibles y los factores de crecimiento, intervenir en el metabolismo de la lactosa, desarrollar propiedades anti mutagénicas, ejercer efecto antitumoral, reducir el colesterol sérico, actuar frente a diversos desórdenes gastrointestinales y estimular el sistema inmune.

Según las sugerencias de la Organización mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), las cepas probióticas deben cumplir criterios de seguridad, funcionalidad, así como también aquellos relacionados con su utilidad tecnológica (Markowiak & Śliżewska, 2017). La seguridad de

una cepa se relaciona con su origen, la ausencia de asociación con cultivos patógenos y el perfil de resistencia a los antibióticos; y los aspectos funcionales refieren a su supervivencia en el tracto gastrointestinal (resistencia a pH ácido, jugos gástricos, bilis), permanencia en el intestino y su efecto benéfico como por ejemplo la capacidad inmunomoduladora (McFarland, 2015; Siesto et al., 2022). En cuanto a los requisitos tecnológicos, se espera que sean de que la producción de grandes cantidades de biomasa sea costo efectiva, que se mantengan viables y estables durante los procesos de almacenamiento y distribución, además de estables genéticamente y resistentes a bacteriófagos (Lee, 2009).

Los probióticos también deben tener efectos beneficiosos sobre la salud documentados, consistentes con las características de la cepa presente en el producto comercializado, considerando además que las propiedades probióticas son particulares de una cepa en determinada dosis y pueden a su vez estar influenciadas por la matriz en la que se encuentra (Sanders et al., 2007). En nuestro país, el Código Alimentario Argentino ha establecido los requisitos y evaluaciones necesarias para los probióticos (CAA, Capítulo XVII, Artículo 1389) indicando que para que una cepa pueda ser utilizada como ingrediente probiótico en alimentos deberá cumplir con un protocolo de evaluación que incluye: la identificación de la cepa (Género/especie/subespecie), la caracterización *in vitro* e *in vivo* de la resistencia gástrica, a bilis y opcionalmente a lisozima, ensayos *in vivo* e *in vitro* que demuestren el o los efectos probióticos adjudicados y que la cepa sea segura, es decir que no presente riesgos para la salud, no presente o promueva la translocación a otros órganos distintos del intestino, y no posea resistencia a antibióticos, actividad hemolítica, ni produzca toxinas.

La mayoría de los probióticos comercializados actualmente son de origen bacteriano entre los que pueden mencionarse los géneros *Lactobacillus* spp. (actualmente dividido en 25 géneros, Zheng et al., 2020), *Bacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp., que se encuentran en el tracto gastrointestinal humano y generalmente se ingieren en alimentos fermentados (Pais et al., 2020). Si bien *Saccharomyces boulardii* ha sido empleada desde hace varias décadas en el manejo de diarrea asociada al consumo de antibióticos (Toothaker & Elmer, 1984), el uso de levaduras probióticas ha cobrado relevancia en los últimos años.

El CIDCA cuenta con una colección de cepas de levaduras aisladas de gránulos de kefir (Garrote et al., 2001; Diosma et al., 2014) y otros alimentos como uvas y vinos. El **kefir** es un producto fermentado tradicional generado por la fermentación de leche con gránulos de kefir cuya estructura de polisacárido y proteína encierra en su interior un consorcio polimicrobiano en asociación simbiótica. El kefir de agua, también conocido como “aquakefir” o “sugary kefir” se obtiene por

fermentación de agua azucarada adicionada de frutas deshidratadas como higos secos o pasas de uva con una comunidad microbiana estable contenida en los gránulos de kefir de agua, lo que da como resultado una bebida ácida y frutada, con bajo contenido alcohólico y levemente efervescente (Bengoa et al., 2020). Cabe destacar, que los gránulos de kefir de leche y kefir de agua son diferentes, no solo macroscópicamente en su matriz estructural sino en su conformación microbiana. Si bien existe una diversidad de microorganismos presentes en distintos gránulos de kefir, se encuentran distintas bacterias lácticas (lactobacilos y lactococos), ácido-acéticas y levaduras. Los azúcares de la leche son fermentados por distintas vías, fundamentalmente fermentación láctica, pero también acido acética y etanólica, siendo el producto final de acidez variable dependiendo de las condiciones de fermentación. Esta dinámica de producción artesanal no solo ha seleccionado el consorcio microbiano, sino que ha seleccionado asociaciones estables con capacidad de tolerar muy bien entornos ácidos. Los microorganismos aislados de kefir han demostrado ser seguros y poseer varias características deseables en los microorganismos probióticos. En particular, *Kluyveromyces marxianus* es un microorganismo considerado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) con estatus GRAS por su sigla en inglés “generally recognized as safe” y asimismo es una especie designada como QPS “qualified presumption of safety” por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), que evalúa la seguridad para seres humanos, animales y el medio ambiente.

La influencia de los nutrientes presentes en el medio de cultivo, así como de las condiciones de crecimiento pueden modificar la expresión de proteínas de superficie y producción de metabolitos, por lo que también podría verse afectada la capacidad probiótica e influir en la producción de etanol. Debido a ello, el efecto del sustrato debe evaluarse cuidadosamente para seleccionar la mejor combinación cepa de levadura-sustrato para la producción simultánea de bioetanol y de biomasa de levadura probiótica.

OBJETIVOS

El Suero de quesería y la melaza de caña de azúcar son dos desechos de la industria alimentaria con potencial aplicación como medios industriales por su alto contenido de nutrientes. Considerando que la capacidad probiótica de un microorganismo depende de parámetros fisiológicos y es condicionada por variables tales como el sustrato y las condiciones de crecimiento, nuestro objetivo inicial fue estudiar si las levaduras del género *Kluyveromyces* pueden ser empleadas en una biorrefinería para producir etanol combustible y que luego de dicho proceso las mismas conserven sus propiedades probióticas.

Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de cepas de levadura *Kluyveromyces marxianus* de desarrollar en lactosuero, permeado de lactosuero y melaza de caña en diferentes condiciones de interés para su aplicación industrial.
- Seleccionar cepas de levaduras en función de su capacidad para producir etanol al crecer en lactosuero y permeado de suero de quesería, en condiciones que emulan los procesos industriales de obtención de bioetanol.
- Estudiar las características probióticas de las levaduras crecidas en los distintos sustratos, focalizando en la actividad antiinflamatoria del tracto gastrointestinal y antagónica contra patógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Se trabajó con las cepas de levaduras NCYC 6, NCYC 100, NCYC 111, NCYC 179, NCYC 587, NCYC 851, NCYC 970, NCYC 1414, NCYC 2791, NCYC 2887, NCYC 2907, NCYC 3344, NCYC 3396, NCYC 1425, NCYC 1426, NCYC 1429, NCYC 2597 y NCYC 2575 obtenidas de la National Collection of Yeast Cultures (NCYC, Norwich, United Kingdom), las cepas CBS 396, CBS 712 y CBS 2359 obtenidas de CBS Filamentous fungi and Yeast Collection (CBS, Utrecht, The Netherlands), cepas UFV-3 pertenecientes a la Universidad Federal de Viçosa Collection, (UFV, Viçosa, Brasil), cepa PE-2 cedida por el Prof. Luiz Carlos Basso (Universidad de São Paulo, Brasil) y las cepas CIDCA 8113, CIDCA 8116, CIDCA 8118, CIDCA 81111, CIDCA 8153, CIDCA 8154, CIDCA 81104, CIDCA 81105, CIDCA 9121 pertenecientes a la colección del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, La Plata, Argentina). Las levaduras CIDCA 81111 y CIDCA 9121 fueron depositadas como LPSc 1425 y LPSc 1426 respectivamente en la Colección Spegazzini (LPSc, La Plata, Argentina) perteneciente a la Culture Collection Information Worldwide (WDCM 1001) (Tabla 1.1).

Todas las cepas se cultivaron en medio YPD (ver anexo) a 30 °C por 24 h sin agitación. Los cultivos fueron almacenados a −80 °C en caldo YPD con 50% (v/v) de glicerol.

Tabla 1.1: Cepas de levaduras utilizadas

Especies	Identificacion [a]	Propiedades relevantes	Referencia
Kluyveromyces marxianus	NCYC 6, NCYC 100 NCYC 111, NCYC 179 NCYC 587, NCYC 851, NCYC 970, NCYC 1414, NCYC 2791, NCYC 2887, NCYC 2907, NCYC 3344, NCYC 3396, NCYC 1425, NCYC 1426, NCYC 1429, NCYC 2597, NCYC 2575	Producción de etanol, crecimiento en anaerobiosis	Lane et al. (2011)
	CBS 396, CBS 712		Signori et al.(2014)
	UFV-3	Producción de etanol, genoma secuenciado	Silveira et al.(2005)
	CIDCA 8113, CIDCA 8116, CIDCA 8118, CIDCA 81111 (LPSc 1425),CIDCA 8153, CIDCA 8154, CIDCA 81104, CIDCA 81105, CIDCA 9121 (LPSc 1426)	Aisladas de gránulos de kefir	Garrote et al.(2001); Diosma et al.(2014)
Kluyveromyces lactis	CBS 2359	No crece en condiciones anaeróbicas	Ishtar Snoek and Yde Steensma (2006)
Saccharomyces cerevisiae	PE-2	No metaboliza lactosa	Della-Bianca & Gombert (2013); Nijkamp et al.(2012)

[a] Colecciones microbianas: NCYC, National Collection of Yeast Cultures (Norwich, United Kingdom); CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) yeast and filamentous fungal collection (Utrecht, The Netherlands); UFV-3, Universidad Federal de Viçosa Collection (Universidade Federal de Viçosa, Brazil); CIDCA, Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (La Plata, Argentina), LPSc, La Plata Spegazzini Collection (La Plata, Argentina) y PE-2 (Prof. Luiz Carlos Basso, Universidad de San Pablo, Brasil).

1.2 Ensayo de crecimiento en placa por diluciones seriadas

El ensayo de crecimiento por dilución seriada en placa se realizó en base al protocolo de Della-Bianca & Gombert (2013) con modificaciones. Células de levadura pertenecientes a una misma colonia se transfirieron en forma aséptica desde placas con medio YGC (ver anexo) a un pre-cultivo con medio YPD y fueron incubadas por 24 h a 30 °C con agitación (200 rpm). Luego de la incubación las levaduras fueron utilizadas para inocular 5 ml de medio YPD logrando una densidad óptica inicial de a 600nm (DO_{600}) de 0,1. Estos nuevos cultivos se incubaron durante 3 h a 30 °C y 200 rpm (hasta fase exponencial temprana). Transcurridas las 3 h de incubación el cultivo se centrifugó a 5000 g x 5 min y el pellet obtenido se resuspendió en agua destilada estéril a una DO_{600} de 0,1 y se realizaron

cuatro diluciones sucesivas en agua destilada estéril (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} and 10^{-4}). Se sembraron gotas de 5 µl de estas diluciones en placas con medio sólido y se incubaron durante 72 h, realizando un registro fotográfico de las mismas a las 24, 48 y 72 h (Figura 1.2). Las placas fueron preparadas con diferentes medios sólidos: melaza de caña de azúcar y suero o permeado de suero de quesería conteniendo 10% p/v de lactosa. Se testearon diferentes condiciones de estrés de relevancia en la industria de producción de etanol tales como presencia de alcohol, medio ácido y baja concentración de oxígeno. Para testear el crecimiento de las cepas en presencia de etanol, a los medios sólidos planteados se le adiciono asépticamente 5 % v/v de etanol 96°. Para preparar las placas con bajo pH, se adicionó H_2SO_4 1 mol/L hasta alcanzar un pH 2,5. La incubación bajo condiciones de anaerobiosis se llevó a cabo utilizando jarra de anaerobiosis con kit comercial Anaero-Pack CO_2 generator (Mitsubishi Gas Chemical Company, Japan). Las placas correspondientes a anaerobiosis debieron ser preparadas por triplicado para poder realizar el registro fotográfico sin modificar la condición de incubación. La temperatura de incubación fue en todas las condiciones de 37 °C.

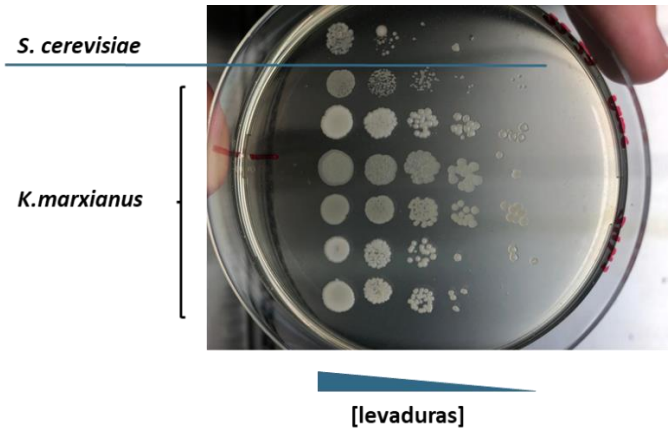


Figura 1.2: Fotografía esquemática de ensayo de crecimiento en placa por diluciones seriadas. Cada fila es una cepa de levadura y cada columna pertenece a una dilución seriada dispuestas en orden creciente hacia la derecha.

1.3 Sistema de fermentación industrial miniaturizado

Se procedió siguiendo el protocolo descripto por Raghavendran et al. (2017). Para ello se inoculó un Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de YPD (4% glucosa) y se incubó a 30°C con agitación 200 rpm. Se testearon dos medios industriales de fermentación: suero de quesería y permeado de suero

ambos resuspendidos en agua destilada al 10% p/v. Luego de 12h de incubación, el cultivo crecido fue transferido a Erlenmeyer de 2 L con 1 L de medio industrial estéril correspondiente, para favorecer la formación de la biomasa a 30°C en forma estática. Luego de 36 h de incubación, el cultivo fue centrifugado (5000 g x 5 min) para obtener un pellet con las células de levadura de aproximadamente 3,6 g (biomasa húmeda). El proceso de obtención de la biomasa húmeda se realizó en tubos falcon estériles de 50 ml previamente pesados, y el pellet obtenido se deja en el mismo recipiente para iniciar el primer ciclo de fermentación. La biomasa húmeda fue resuspendida con 2 ml de "vinho" (sobrenadante del cultivo anterior) y 2 ml de agua destilada. Lo que se obtiene es una suspensión de levaduras que comúnmente se denomina "pe-de-cuba" en los procesos de obtención de etanol de 1G en Brasil (Figura 1.3).El proceso de fermentación fue llevado a cabo de dos formas diferentes como cultivo batch alimentado o como cultivo batch; en el primer caso a los tiempos 0, 2 y 4 horas se adicionaron 9,25 ml de medio industrial fresco y estéril, y para el segundo se realizó una única adición de 27,75 ml del medio industrial estéril y fresco a tiempo cero. Cada dos horas, los tubos se agitaron suavemente para liberar el CO_2 atrapado y se pesaron. Este último procedimiento de pesado se realizó hasta completar las 10 h de fermentación. Finalizado un ciclo de fermentación, los tubos se dejaron en la mesada a temperatura ambiente semi abiertos durante 15 h. Los los tubos se agitaron y pesaron, luego se homogeneizaron y se tomó una muestra de 1 ml para el posterior análisis microbiológico (viabilidad y contaminación). Los tubos fueron centrifugados (5000 g x 5 min) y el sobrenadante fue almacenado a -20 °C para análisis de metabolitos extracelulares por HPLC. El pellet fue tratado con ácido sulfúrico 1 mol/L (hasta alcanzar pH 2,5) durante 1 hora. Finalmente, los tubos se centrifugaron nuevamente para retirar el ácido del cultivo y el pellet obtenido fue utilizado como "pe-de-cuba" del nuevo ciclo de fermentación. Este procedimiento fue repetido para cada uno de los 5 ciclos consecutivos de fermentación. El ensayo se llevó a cabo a diferentes temperaturas de fermentación 30°C, 34°C y 37°C. Cada ensayo se trabajó con duplicados biológicos.

Los cálculos de rendimiento de producción de etanol fueron previamente descriptos por Raghavendran et al. (2017), donde se emplearon factores de corrección para cultivos de alta densidad celular. La viabilidad celular fue evaluada mediante la tinción de levaduras con azul de metileno y recuento al microscopio óptico en cámara de Newbauer.

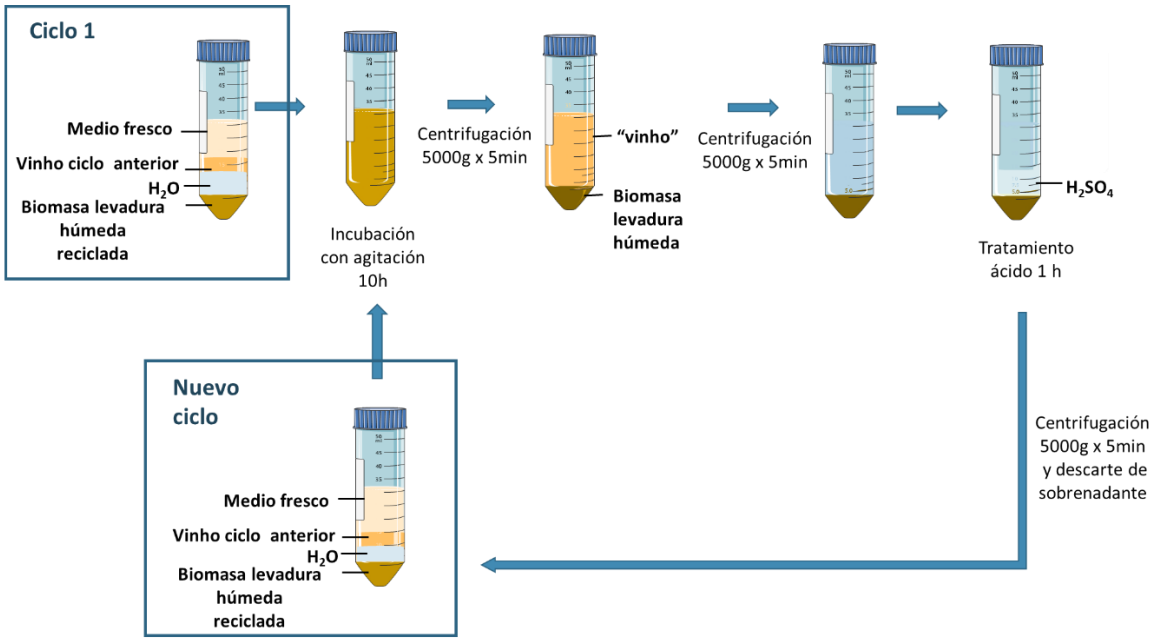


Figura 1.3: Esquema secuencial de sistema de producción de etanol industrial 1G miniaturizado. En total se realizan 5 ciclos de fermentación consecutivos.

1.3.1 Determinación de metabolitos extracelulares y parámetros fisiológicos

Durante el cultivo se tomaron muestras para determinar la absorbancia de la suspensión celular, el pH del medio y la concentración de metabolitos consumidos (azúcar) o producidos (etanol) por las levaduras. Para los metabolitos se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC Accela - Thermo Scientific), con la columna analítica BioRad (Hércules, EE.UU.) modelo Hyper REX XP; se eluyó con solución de H_2SO_4 0,0075 M a un caudal de 0,6 ml/min. Los compuestos fueron detectados por Refractómetro Waters 410 (sensibilidad 32, factor de escala 20), con el límite mínimo de la detección fue: 0,01 g/L para azúcares, 0,025 g/L para etanol, glicerol y ácido acético. Con las determinaciones analíticas realizadas y los datos disponibles durante el cultivo en tubos cilíndricos de 50 ml, se determinaron el rendimiento de etanol realizado de acuerdo con Raghavendran et al. (2017), como se indica a continuación:

$$\text{Rendimiento de Etanol} = \frac{Etanol\ producido}{Azúcar\ consumido} = \frac{Etanol_{final} - Etanol_{inicial}}{Azúcar_{inicia} - Azúcar_{final}}$$

$Etanol_{final}$ = *[Etanol (g)en vinho] + [Etanol (g)en biomasa húmeda]*

$Etanol_{final}$ = *[vinho - HPLC (g/L) x volume de vinho(L)] + [[0.7 (mL/g)] x [peso de biomasa húmeda(g)] x [Etanol (g/mL)]*

$Etanol_{inicial}$ = *[Etanol (g) en 2ml de vinho anterior] + [Etanol (g) en biomasa húmeda]*

$Etanol_{inicial}$ = *[2 (volume de vinho agregado en pe-de-cuba)] x [Vinho del ciclo anterior – HPLC (g/mL)] + [0.7 (mL/g)] x [peso de biomasa húmeda (g)] x [Etanol del ciclo previo (g/mL)]*

$Azúcar_{inicial}$ = *[Azúcar (g) en medio]*

$Azúcar_{inicial}$ = *[Azúcar (g/mL) en medio] x [Volumen de medio agregado (mL)]*

$Azúcar_{final}$ = *[Azúcar (g) en vinho]*

$Azúcar_{final}$ = *[Azúcar (g/mL) en vinho] x [Volumen de vinho(mL)]*

**Azúcar= lactosa*

1.4 Ensayo de Resistencia al pasaje gastrointestinal in vitro

Se prepararon las soluciones que simulan fluidos gástrico e intestinal según describe Grimoud et al. (2010). Se obtuvo un cultivo en fase estacionaria de cada levadura a testear y los mismos fueron lavados dos veces con solución buffer fosfato estéril (PBS, ver anexo) y al finalizar, se resuspendieron en solución gástrica estéril de pH 2,5 (ver anexo) logrando una concentración de levaduras de 10^7 UFC/mL. Las suspensiones fueron incubadas a 37°C con agitación 200 rpm por 90 minutos. Transcurrido este tiempo las células se lavaron 2 veces con PBS estéril y fueron resuspendidas en solución intestinal pH 8 (ver anexo). Las suspensiones fueron incubadas a 37°C con agitación 200 rpm durante 3h. La viabilidad celular fue determinada mediante recuento en placa de agar YGC al comienzo del ensayo y luego de cada incubación, empleando la técnica de la gota (Figura 1.4).

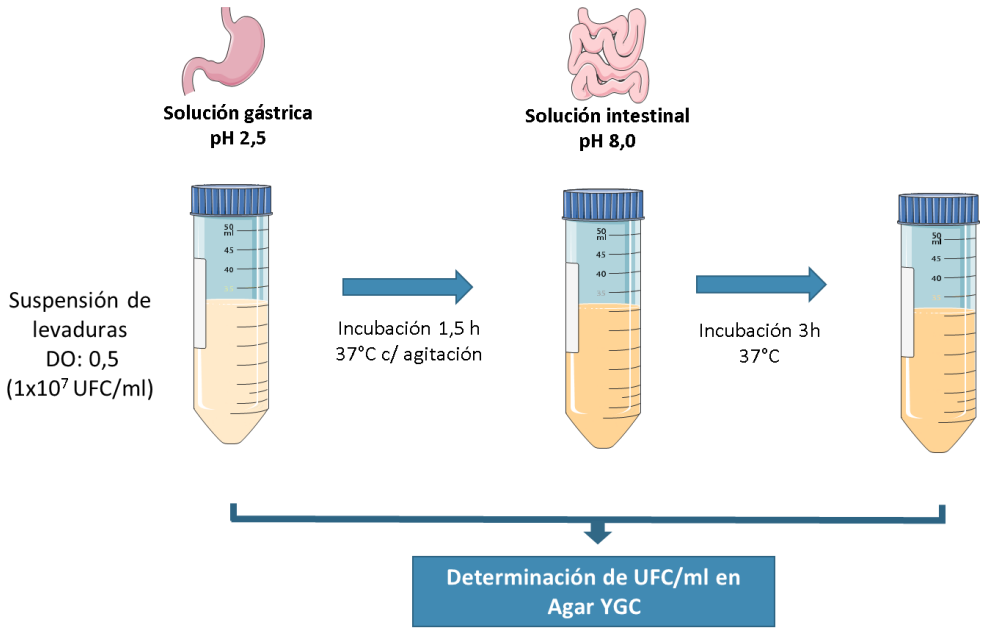


Figura 1.4: Esquema secuencial de prueba de supervivencia al tracto gastrointestinal in vitro.

1.5 Recuento de microorganismos viables en medio sólido

Para llevar a cabo el recuento de microorganismos viables en medio sólido, se realizaron diluciones seriadas 1/10 a partir de la muestra según corresponda, utilizando eppendorf con 900 µl de solución fisiológica estéril. Se sembraron 100 µl de tres diluciones por duplicado esparciendo el volumen en la placa con perlas de vidrio estériles. La cantidad de diluciones que se prepararon dependieron del número de estimados de microorganismos que se quisieron contar en cada ensayo de modo tal que luego de la incubación se pueden contar entre 30 y 300 colonias en al menos una de las diluciones. Se utilizaron en todos los casos placas de plástico estériles con agar YGC y las condiciones de incubación fueron 24h a 30ºC.

1.6 Recuento de microorganismo por técnica de la gota

El recuento de levaduras por técnica de la gota se basa en método descripto por Miles & Misra, (1938)**.** En cada ensayo, a partir de la muestra se realizaron diluciones seriadas 1/10 en solución fisiológica estéril pH 7 y se sembraron 20 µl de cada dilución por duplicado en placas con medio sólido. Se incubó a 37 °C, se contaron las unidades formadoras de colonias y se expresaron los resultados como UFC/ml.

1.7 Ensayo de caracterización de respuesta inmunomoduladora de inflamación intestinal en células Caco-2 ccl20: Luc in vitro

El sistema reportero Caco-2 ccl20: luc consiste en la línea celular Caco-2 que ha sido transfectada en estable con el gen de la luciferasa de luciérnaga (*Lampryda noctiluca*) bajo el control del promotor de la quimoquina CCL20 (Nempont et al., 2008). CCL20 es una quimoquina atractante de células dendríticas y en menor medida de macrófagos y cumple un rol importante tanto en la respuesta inmune intestinal como en la formación de epitelio y tejidos linfoides asociados a mucosas. El promotor de CCL20 es altamente inducible mediante estímulos proinflamatorios como es el caso de los agonistas de receptores tipo Toll (Toll like receptors, TLR). Por lo tanto, cuando las células son estimuladas con un agonista de TLR (como la flagelina, LPS, IL-1 β, TNF-α), el promotor de CCL20 se activa, lo que resulta en un aumento en la expresión de la enzima luciferasa. De esta manera, la actividad de la luciferasa medida en el sistema es proporcional a la expresión del gen de CCL20 y refleja la activación de la respuesta inmune innata en las células (Romanin et al., 2010).

Se determinó la capacidad inmunomoduladora de las cepas de levaduras de *Kluyveromyces marxianus* crecidas en medio YPD, en suero o permeado de suero de quesería y en la biomasa de la cepa CIDCA 9121 obtenida luego de cinco ciclos de fermentación en sistema miniaturizado previamente descripto. Las células Caco-2 ccl20: luc se crecieron en microplacas de 48/96 celdas en DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle´s Minimum Essencial Medium, ver anexo); suplementadas con 15% (v/v) suero fetal bovino inactivado con calor, 1% (v/v) aminoácidos no esenciales y antibióticos (penicilina 12 UI/ml, estreptomicina 12µg/ml y gentamicina 50µg/ml). Las células se utilizaron 24 h postconfluencia.

La biomasa húmeda de levadura se resuspendió en medio DMEM a razón de DO_{600nm} = 0.5 (~10^7 CFU/mL). Los cultivos celulares fueron incubados durante 30 min con la suspensión de levaduras a 37°C en una atmosfera 5% CO_2. Al cabo de esta incubación se añadió a las fosas la suspensión de flagelina de *Salmonella tyhimurium* (FliC) 1 µg/ml y se incubó durante 5 h en atmosfera 5% CO_2 (Figura 1.5). Todos los ensayos incluyeron un control de la actividad basal de las células que no recibieron ningún tratamiento, solo fueron incubadas con medio DMEM y con este mismo se obtuvo el 100% de actividad luciferasa. Luego de la última incubación las células son tratadas con buffer de lisis (Promega, Madison, WI, USA). La actividad luciferasa es determinada mediante la medición de luminiscencia con luminómetro Labsystems Luminoskan TL Plus (Thermo Scientific, USA) utilizando Luciferase Assay System.

Los resultados se evaluaron como luminiscencia normalizada con el control y expresada como porcentaje de luminiscencia ± error estándar de la media (NAL ±SEM) de al menos tres experimentos independientes.

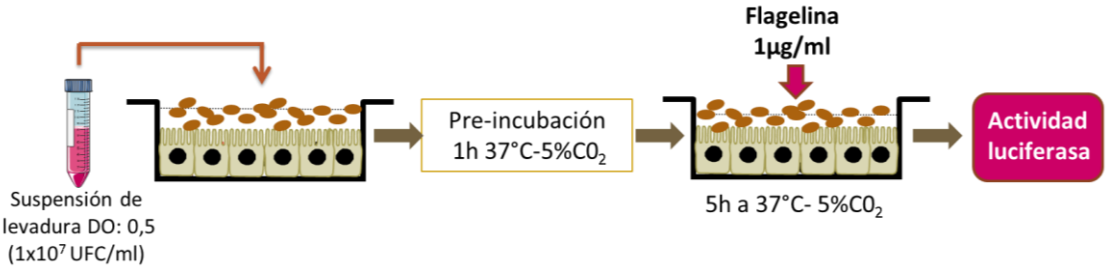


Figura 1.5: Ensayo de inmunomodulación *in vitro* en sistema reportero Caco2 ccl20:luc.

1.8 Ensayos con animales de laboratorio

1.8.1 Animales utilizados y condiciones de alojamiento

Se trabajó con ratones macho Balb/c pertenecientes a la categoría SPF (libre de patógenos específicos), de 6 semanas de edad los cuales fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Los progenitores de esta cepa se obtuvieron del *National Institute of Health* (NIH, EE.UU). Los ratones fueron trasladados al bioterio del Instituto de estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP, CONICET-UNLP) en cajas de transporte 5 días antes de iniciar el protocolo de manera tal de permitir la aclimatación de los animales al nuevo ambiente. Esto permitió reducir el estrés de los animales por el traslado y el cambio de las condiciones de alojamiento a la hora de realizar el ensayo. Los ratones fueron mantenidos en cajas de policarbonato con un lecho de viruta esterilizada en grupos de cinco animales por caja. Se mantuvieron a una temperatura de 22 ± 1 °C, con humedad controlada (60-80%) y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Los ratones fueron alimentados *ad libitum* con una dieta comercial y agua previamente esterilizadas. El protocolo experimental utilizado en este trabajo fue evaluado y aprobado por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP (N° protocolo 011-01-15).

1.8.2 Evaluación Inocuidad y Resistencia al pasaje gastrointestinal in vivo

Este ensayo se realizó con ratones distribuidos en 2 grupos de 5 animales cada uno, todos ellos alimentados *ad libitum* con una dieta comercial (Nuvital, Curitiba, Brasil). El grupo tratamiento recibió *ad libitum* una suspensión de levaduras de 10^7 UFC/ml *K. marxianus* CIDCA 9121 en el agua de bebida durante 7 días y los animales del grupo control solo recibieron agua. Se recolectaron las heces de los días 2, 3 y 7, se pesaron y se diluyeron 100 veces con solución fisiológica estéril para realizar un recuento de UFC /g mediante recuento por técnica de la gota en YGC. Al día 8, se sacrificaron 3 animales por grupo por dislocación cervical y se tomaron porciones de 1 cm de largo del tracto gastrointestinal (duodeno, íleon, ciego y colon) se disecaron y el contenido intestinal del lumen se resuspendió en solución fisiológica para realizar recuento de levaduras en YGC. Los resultados fueron expresados como UFC/cm de tejido.

1.8.3 Evaluación de Traslocación bacteriana

Para poder determinar si la levadura administrada es capaz de dañar la pared intestinal y translocar a otros órganos se tomaron muestras de bazo e hígado en forma aséptica y se sumergieron en medio YPD estéril de manera de obtener 1 g de órgano/10 ml de medio. Estas suspensiones fueron homogeneizadas mecánicamente utilizando perlas de vidrio y vortex para disgregar el tejido y propiciar la liberación al medio liquido de los microorganismos presentes en la muestra. Todas las suspensiones fueron incubadas durante 72 h a 37°C y cada 24 h se tomaron muestras y se sembraron en placas con medio YGC.

1.8.4 Evaluación de la capacidad moduladora de respuesta inflamatoria en un modelo murino de colitis inducido ácido 2,4,6-trinitrobencen-sulfónico (TNBS)

Los animales se dividieron en cuatro grupos (6 animales por grupo) según la administración y la inoculación, de la siguiente manera: Agua/Vehículo, Levadura/Vehículo, Agua/TNBS y Levadura/TNBS (Figura 1.6). Dos grupos recibieron agua normal y otros dos recibieron una suspensión de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 que contenía $1x10^7$ levaduras/mL durante cuatro días con cambios diarios de la suspensión. Al día 4 se realizó una única administración intrarrectal de 2,5 mg de ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS, Sigma, USA) en 50 % etanol como vehículo con un volumen final de 200 µL. Los grupos denominados “vehículo” al día 4 fueron inoculados con etanol 50% en agua destilada (Romanin et al. 2010). Después de 48 h de inoculación de TNBS, los

animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se tomaron muestras de colon para análisis histológico.

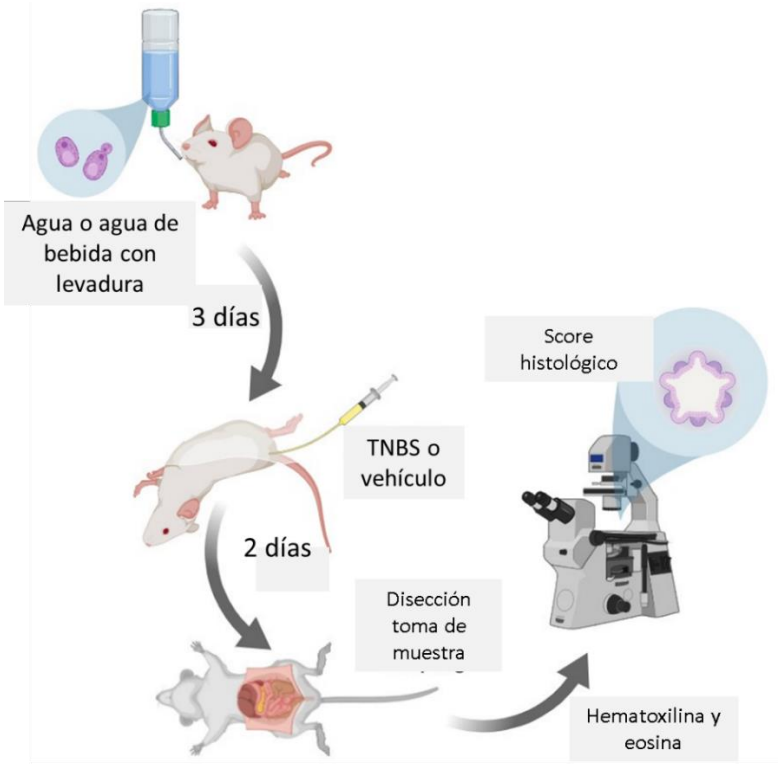


Figura 1.6: Ensayo de inmunomodulación in vivo en modelo murino de colitis inducida por TNBS

1.8.5 Histología y Score histopatológico

Los segmentos de recto de los animales se fijaron en paraformaldehído al 10%, se deshidrataron en un tren de deshidratación que incluye 3 incubaciones en etanol (50%, 70% y 100%) y dos incubaciones en Xilol al 100%. El tejido se incluyó luego en parafina fundida a 60°C. Se tomaron secciones de 7-10 µm de espesor utilizando un microtomo, se fijaron las secciones en portaobjetos con calor y se eliminaron los restos de parafina lavando con xilol. Se rehidrataron los preparados utilizando el tren de deshidratación en sentido inverso. Los preparados, lavados con agua destilada para eliminar los restos de etanol, se sumergieron durante 10 min. en una preparación de hematoxilina, se lavaron con etanol y luego con agua destilada hasta eliminar los restos del colorante. Se sumergieron los preparados en eosina durante 30 segundos y se enjuagaron con agua destilada, se deshidrataron nuevamente el preparado y se dejaron 10 min. en xilol, Luego del secado, se montaron el cubreobjetos con resina de montaje (tinción hematoxilina-eosina) y

extracción de ARN. El daño histopatológico se determinó siguiendo el criterio de actividad histopatológica descripto Obermeier et al. (1999). Este sistema registra dos puntajes por separado que luego se suman, según como se muestra en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2: Score histopatológico utilizado en Modelo murino de colitis por TNBS

Daño epitelial		**Infiltrado celular**	
Ninguno	0	Ninguno	0
Mínima perdida de células caliciformes	1	Infiltrado alrededor de la base de las criptas	1
Pérdida importante de células caliciformes	2	Infiltrado en la capa musculares de la mucosa	2
Pérdida mínima de criptas y extensa de células caliciformes	3	Extenso infiltrado en la musculares de la submucosa y edema	3
Pérdida extensa de criptas	4	Infiltrado en la submucosa	4

El daño se estimó de forma doble ciego según el índice de actividad histopatológica (HAI) descrito por Alex et al., (2009).

1.9 Ensayo de Autoagregación

Se prepararon suspensiones de las levaduras de DO_{600} = 0,5 en buffer fosfato pH 7. Se colocaron 2ml de la suspensión bacteriana en cubetas de vidrio cilíndricas, se agito y se introdujo la cubeta en el espectrofotómetro METROLAB 330. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente entre 22 y 24 °C. Inmediatamente se tomó la densidad óptica inicial y luego se midió la disminución de la turbidez de las suspensiones cada 10 minutos durante 1 hora.

1.10 Ensayo de Co-agregación de levadura con Salmonella enterica serovariedad Enteritidis

Se trabajó con una cepa de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis CIDCA 101 (*S*. Enteritidis) aislada de una muestra clínica en el Hospital de Pediatria Prof. Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina, fue provista por el Dr. H. Lopardo. La cepa se conservó a -80 °C, se reactivó en caldo nutritivo y luego se sembró en agar nutritivo inclinado que se mantuvo a 4 °C. Para todos los ensayos, se tomó una ansada y se creció en caldo nutritivo a 37 °C durante 18 horas.

Para estudiar la co-agregación se tomó 1 ml de la suspensión de levaduras con una DO_{610}= 0,6 y 1 ml de la suspensión de *S*. Enteritidis con una DO_{610}= 1, se mezclaron durante 10 segundos en vortex, se introdujo la cubeta con la mezcla en el espectrofotómetro e inmediatamente se tomó la densidad óptica inicial. Luego, se realizaron las lecturas de la densidad óptica cada 10 minuto durante 1 hora. Los resultados se expresaron como cinética de co-agregación graficando DO *vs* tiempo.

1.11 Ensayo de Adhesión a células de epitelio intestinal in vitro

La línea celular Caco-2 es un modelo de epitelio intestinal de origen humano proveniente de un adenocarcinoma de colon (ATCC HTB-37) (Fogh y Orfeo, 1977) que exhibe un patrón de diferenciación estructural y funcional característica de los enterocitos, como por ejemplo ribete en cepillo, uniones estrechas funcionales y alto nivel de enzimas asociadas al ribete en cepillo como fosfatasa alcalina, sacarasa isomaltasa y aminopeptidasa.

Se estudió la adhesión de levaduras *Kluyveromyces marxianus* a monocapas de células intestinales Caco-2/TC-7 (ver anexo). El ensayo comenzó con el lavado de las monocapas con PBS (Figura 1.7). A cada fosa se añadieron 500 µl de una suspensión de levadura previamente lavada con PBS, la cual fue llevada a un valor de DO_{600} = 0,5, obtenido de un cultivo en fase estacionaria (0,5-1 x10^7 UFC/ml), y resuspendida en DMEM de adhesión (ver Anexo). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 1 hora en una atmósfera controlada (5 % CO2 – 95 % aire), sin agitación. Posteriormente, se lavaron tres veces con PBS para eliminar las bacterias no adheridas. En cada fosa se añadieron 500 µl de agua bidestilada estéril y se dejaron durante 1 h a 37 °C para permitir la lisis y desprendimiento de la monocapa. Se tomó todo el volumen de la fosa, se realizaron diluciones seriadas en solución fisiológica y se procedió al recuento de microorganismos viables en agar YGC. Las placas fueron incubadas a 30°C en aerobiosis durante 24 horas, y las levaduras adheridas se expresaron en UFC/ml como la media de tres replicados en al menos dos ensayos independientes. Además, se calculó el porcentaje de adhesión (%ADH):

$$\%ADH = \frac{levaduras\ adheridas}{levaduras\ iniciales} * 100$$

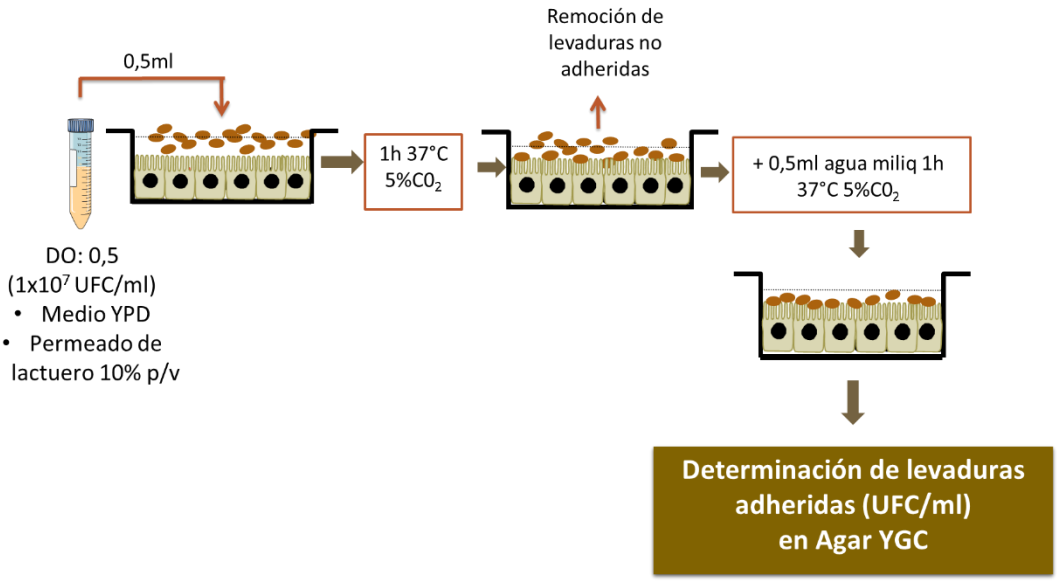


Figura 1.7: Ensayo de adhesión de levaduras crecidas en medio YPD o permeado de lactosuero a células del epitelio intestinal Caco-2 TC7.

1.12 Estudio del antagonismo frente asociación e invasión de Salmonella Enteritidis a *células Caco-2/TC7*

Para evaluar el efecto de las levaduras sobre la asociación/invasión de *S.* Enteritidis a las células epiteliales intestinales, se analizó el comportamiento del patógeno en tres tratamientos diferentes (Figura 1.8).

1.12 a- Efecto sobre los enterocitos pretratados con levadura

Las células Caco-2 TC7 se preincubaron con 0,5 ml de suspensión de levadura en DMEM (DO_{610nm}=0,5) durante 1 h a 37 ºC en 5% CO2 - 95% aire y Luego se lavó tres veces con PBS antes de agregar la suspensión de *Salmonella.*

1.12 b- Efecto de la coincubación de Salmonella con la levadura antes de encontrar los enterocitos

Se mezclaron suspensiones de levadura (10^7 UFC/ml) y *Salmonella* (10^7 UFC/ml) y se incubaron conjuntamente en PBS durante 1 h a 37ºC. Luego, la suspensión mixta se centrifugó (2900 g durante

4 min), se resuspendió en el mismo volumen de DMEM y se agregaron 0,5 ml de la mezcla a cada pocillo.

1.12 c- Efecto de los metabolitos producidos por la levadura (sobrenadante libre de células) sobre Salmonella antes del contacto con las células epiteliales

En este caso, el SLC se obtuvo mediante centrifugación (4200 g durante 5 min) y filtración (diámetro de poro de 0,22 µm) de un cultivo de levadura fresco. *Salmonella* (10^7 UFC/mL) se incubó 1 h a 37ºC en SLC de levaduras y, luego, la suspensión se centrifugó, el sedimento se resuspendió en DMEM y se agregaron 0,5 ml de esta suspensión a cada pocillo. La asociación e invasión de *S.* Enteritidis después de estos tres tratamientos diferentes se determinó como se describió anteriormente.
La asociación e invasión de *S*. Enteritidis a células Caco-2/TC-7 se evaluó según Zavala et al. (2016) con modificaciones. Primero, las monocapas confluentes Caco-2/TC-7 se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente se agregaron 0,5 mL de suspensión de *S*. Enteritidis (según como se detalló anteriormente) y se incubó 1 h a 37 °C en atmósfera controlada. Para los ensayos de asociación, las monocapas se lavaron tres veces con PBS después de la incubación y luego se lisaron añadiendo 0,5 ml de agua bidestilada estéril. El número de *S*. Enteritidis viables asociadas (adheridas más invasoras) con células Caco-2/TC-7 se determinó sembrando en placas de agar nutritivo diluciones seriadas de la cada fosa y contando las colonias después de la incubación (24 h a 37 °C). El porcentaje de asociación de *S*. Enteritidis se calculó como:

$$\%Asociación = \frac{UFC\ asc}{UFC\ i} * 100$$

donde UFC_{asc} es el recuento final de *S*. Enteritidis asociado y UFC_i corresponde al recuento inicial agregado a la fosa.

La invasión de *Salmonella* se determinó contando las bacterias dentro de las células Caco-2/TC-7. Para este propósito, las monocapas incubadas con *S.* Enteritidis como se describió anteriormente, se trataron con 0,5 ml/pocillo de gentamicina (100 µg/mL de PBS) durante 1 h a 37 °C. Finalmente, se lisaron las células y se contaron las colonias como se describe anteriormente. El porcentaje de *S.* Enteritidis internalizado se calculó como:

$$\%Invasión = \frac{UFC\ int}{UFC\ i} * 100$$

donde UFC_{int} representa el recuento final de *Salmonella* internalizada mientras que UFC_i es el recuento inicial de *Salmonella* agregado al pocillo.

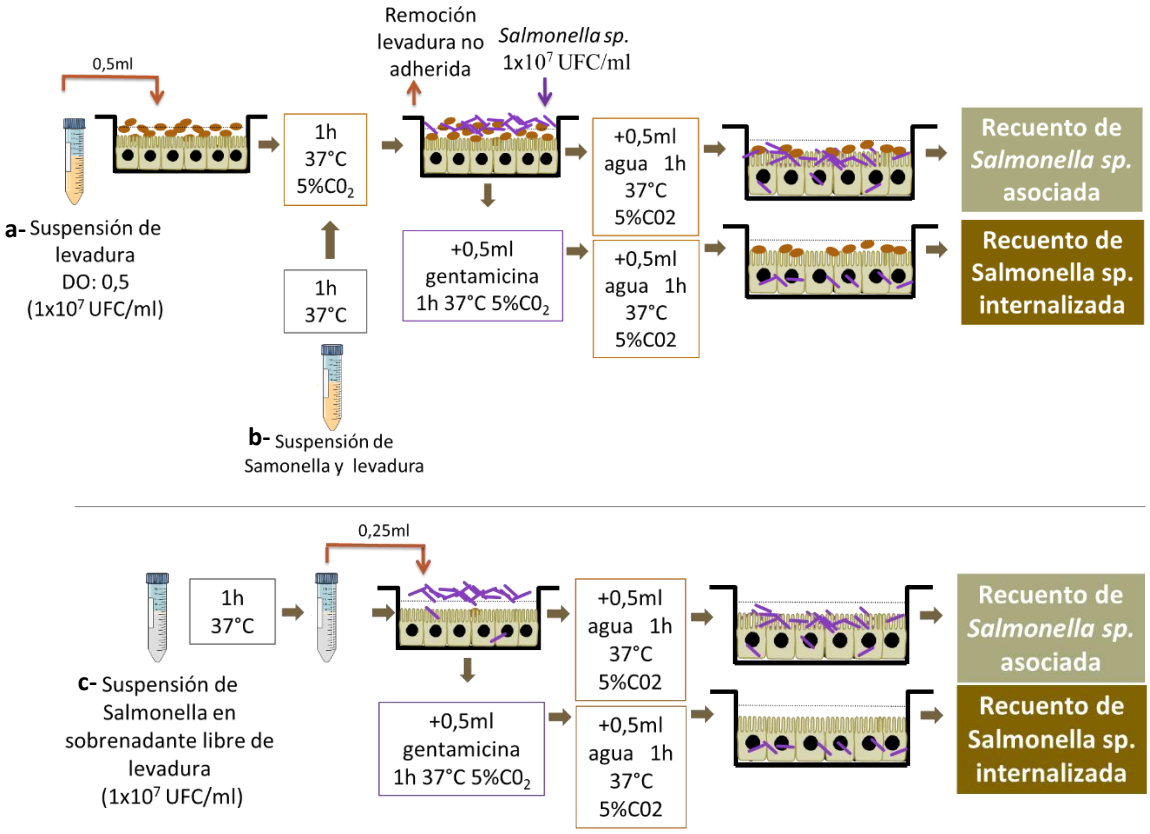


Figura 1.8: Estudio del antagonismo frente asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis a células Caco-2/TC7.

1.13 Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 8.02 para Windows (San Diego, CA, USA). Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (DS). Para la comparación de medias, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) seguido del Test de Tukey o Dunnett. En particular para los ensayos de producción de etanol en sistema miniaturizado (1.3) para las comparaciones entre grupos se utilizaron el Test de Student no pareado y Test de Mann Whitney. Se consideraron diferencias significativas aquellas con un valor de $p < 0,05$.

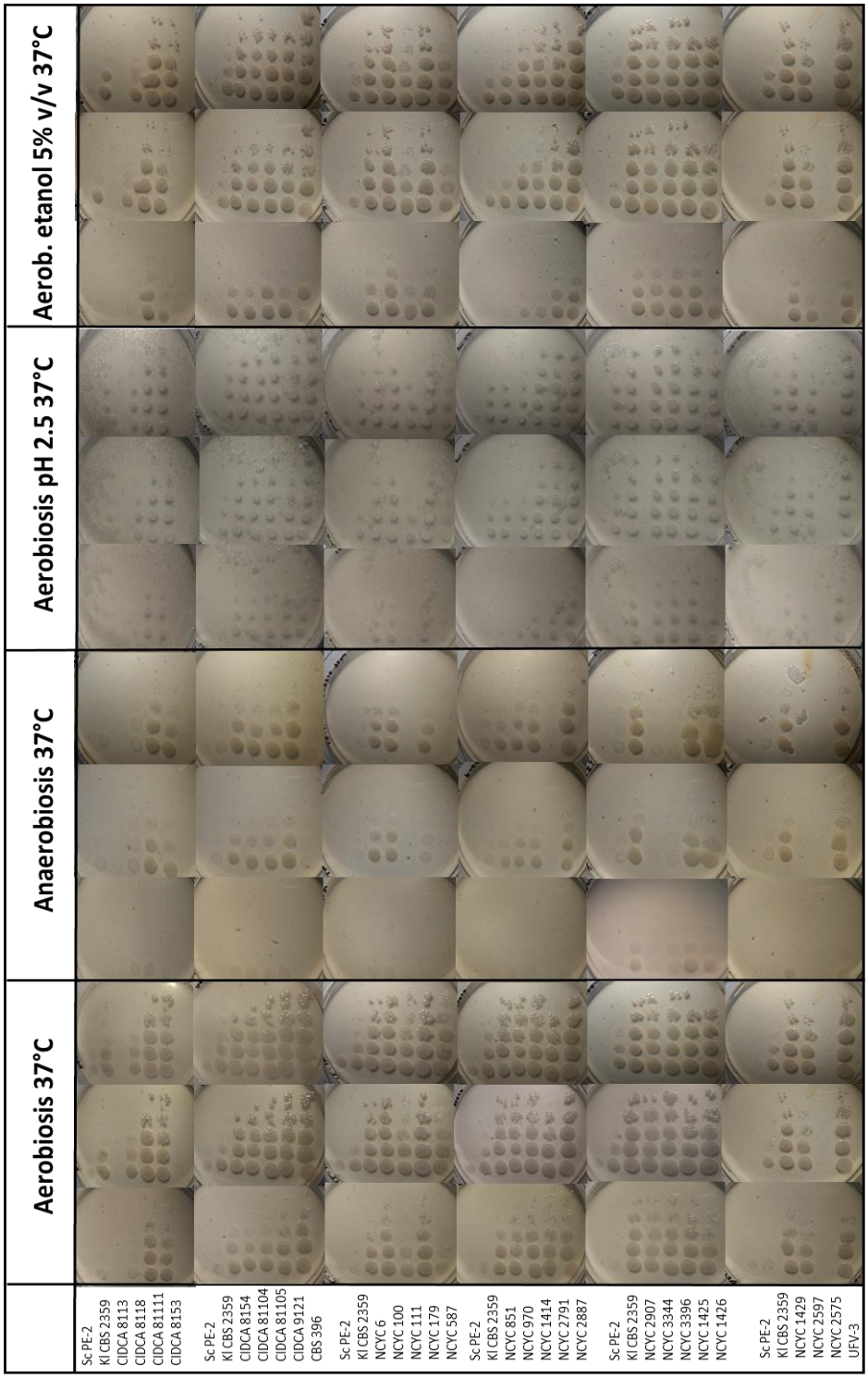
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de cepas de *Kluyveromyces marxianus* según su capacidad de crecer en diferentes medios industriales

La selección de cepas de *Kluyveromyces marxianus* para ser utilizada en un proceso de biorrefinería que utiliza suero de quesería o melaza de caña de azúcar como medio industrial para la obtención de etanol y biomasa probiótica comenzó seleccionando cepas basándonos en su capacidad para crecer en los distintos medios propuestos y las condiciones industriales de interés. Se tomó como modelo la biorrefinería de producción de etanol a partir de melaza de caña de azúcar por fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* utilizada en Brasil que plantea una biorrefinería no aséptica con reciclado de levaduras entre ciclos fermentativos consecutivos. El reciclado de la biomasa de levadura implica un tratamiento con ácido sulfúrico para reducción microorganismos contaminantes. Además, el proceso fermentativo se lleva a cabo en una atmósfera anaerobia, ya que los tanques no tienen ningún tipo de aeración. Dada la composición de cada uno de los medios planteados, las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso, y la amplia variabilidad entre cepas desde el punto de vista genético (Lertwattanasakul et al 2015; Fasoli et al. 2016) como metabólico (Rocha et al. 2011; Fasoli et al. 2016), se planteó la selección de cepas de levaduras *Kluyveromyces marxianus* de una colección de 28 microorganismos detallados en la Tabla 1.1. La levadura *K. lactis* CBS 2359 y *S. cerevisiae* PE-2 fueron utilizadas como cepas control en este ensayo, la primera es capaz de consumir lactosa, pero no crece en ausencia de oxígeno (Ishtar Snoek & Yde Steensma 2006), y la segunda no es capaz de crecer con lactosa como única fuente de carbono.

El medio agarizado suero de quesería se preparó resuspendiendo suero de quesería comercial de tal manera que la concentración final de lactosa sea de 100g/L (suero comercial 10% p/v). El medio formulado a base de melaza de caña de azúcar se preparó llevando la concentración de azúcares reductores totales a 200 g/L (los detalles de preparación pueden verse en ANEXO). Dependiendo del experimento, a los medios se les adiciono etanol al 5% (v/v) y el pH se ajustó a 2,5 con ácido sulfúrico.

A.


Aerob. etanol 5% v/v 37°C
Aerobiosis pH 2.5 37°C
Anaerobiosis 37°C
Aerobiosis 37°C
Sc PE-2
KI CBS 2359
CIDCA 8113
CIDCA 8118
CIDCA 81111
CIDCA 8153
Sc PE-2
KI CBS 2359
CIDCA 8154
CIDCA 81104
CIDCA 81105
CIDCA 9121
CBS 396
Sc PE-2
KI CBS 2359
NCYC 6
NCYC 100
NCYC 111
NCYC 179
NCYC 587
Sc PE-2
KI CBS 2359
NCYC 851
NCYC 970
NCYC 1414
NCYC 2791
NCYC 2887
Sc PE-2
KI CBS 2359
NCYC 2907
NCYC 3344
NCYC 3396
NCYC 1425
NCYC 1426
Sc PE-2
KI CBS 2359
NCYC 1429
NCYC 2597
NCYC 2575
UFV-3

B.

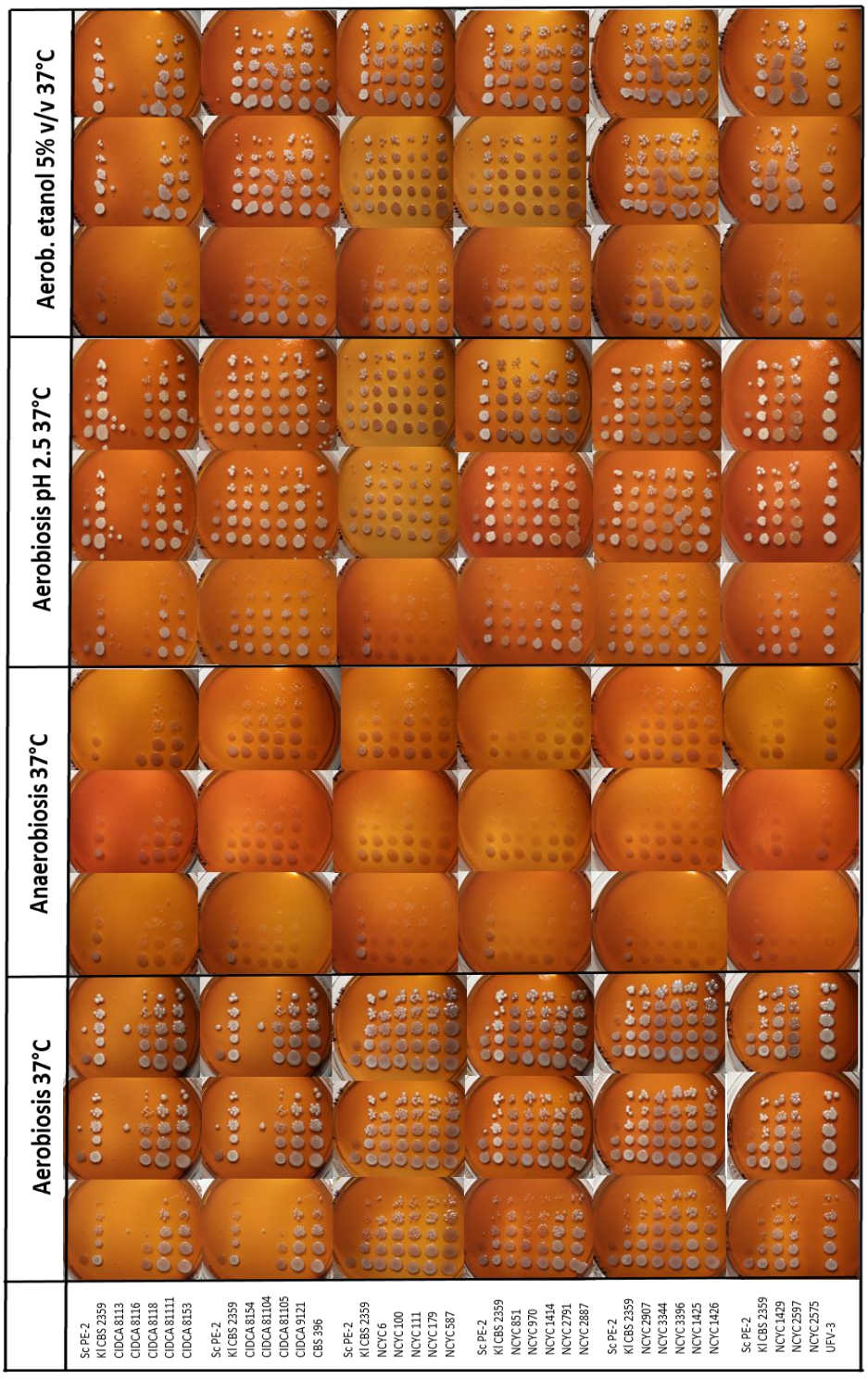


Figura 1.9: Ensayo de crecimiento en placa por diluciones seriadas de cepas de *Kluyveromyces marxianus* (izquierda a derecha $DO_{600:}$ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} y 10^{-5}) **A**. Crecimiento de diluciones seriadas en medio suero de quesería agarizado. **B**. Crecimiento de diluciones seriadas melaza de caña de azúcar agarizado. Cada fila representa una cepa diferente y cada columna una condición específica de incubación. Se muestran 3 registros fotográficos a los tiempos 24, 48 y 72h de incubación a 37°C para cada condición.

A partir de los resultados que se muestran en la Figura 1.9. Se construyeron tablas con *scores* numéricos donde se contabilizó el número de spots o diluciones en las que cada cepa mostró crecimiento visible para cada condición ensayada. Los mayores puntajes fueron para las cepas que mostraron mejor crecimiento, mayor número de gotas y más rápido en las condiciones ensayada (Figura 1.10). De esa manera, las levaduras *K. marxianus* CIDCA 81111, CIDCA 81105, CIDCA 9121, NCYC 100, NCYC 2887, NCYC 2907, NCYC 3344, NCYC 3396, NCYC 1425 y NCYC 1429 fueron las 10 cepas con mayor puntaje creciendo en suero de quesería y, por otro lado, CIDCA 81111, CIDCA 9121, CIDCA 8153, NCYC 1425, NCYC 3396, NCYC 3344, NCYC 2907, NCYC 2887, NCYC 111 y NCYC 1429 en medio melaza de caña de azúcar.

A.

Número de Spots crecidas en cada condición utilizando suero de quesería como sustrato														
Condición	Aerobiosis 37°C			Anaerobiosis 37°C			Aerobiosis pH 2.5 37°C			Aerobiosis Etanol 5% v/v 37 °C			Total	Posición
cepas/ tiempo de incubación	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h		
NCYC 2907	4	5	5	0	2	3	3	4	5	2	5	5	43	1st
NCYC 2887	3	5	5	0	2	3	3	5	5	2	4	5	42	2nd
CIDCA 81111	4	5	5	0	2	3	2	4	4	2	4	5	40	3rd
NCYC 100	3	5	5	0	2	3	1	4	4	3	5	5	40	4th
NCYC 3344	4	5	5	0	0	0	3	5	5	2	5	5	39	5th
NCYC 1429	3	5	5	0	2	3	2	3	4	2	4	5	38	6th
NCYC 3396	3	5	5	0	0	0	3	5	5	2	5	5	38	7th
CIDCA 9121	2	5	5	0	3	3	2	4	4	1	4	4	37	8th
NCYC 1425	3	5	5	1	2	2	3	3	3	2	4	4	37	9th
CIDCA 81105	2	5	5	0	2	3	2	4	4	2	4	4	37	10th
NCYC 179	4	5	5	0	0	2	1	3	4	2	5	5	36	
CBS 396	4	5	5	0	0	0	2	4	4	2	5	5	36	
NCYC 1426	2	5	4	0	2	3	2	4	4	1	4	4	35	
CIDCA 8153	3	5	5	0	1	2	2	3	4	1	3	4	33	
NCYC 6	2	4	4	0	1	2	1	4	4	2	4	5	33	
CIDCA 81104	2	4	5	0	1	2	2	4	4	1	4	4	33	
NCYC 1414	3	5	5	0	1	2	1	3	5	1	3	4	33	
CIDCA 8154	2	4	4	0	1	2	2	4	4	1	3	4	31	
NCYC 2791	3	4	4	0	0	0	2	3	4	2	3	5	30	
NCYC 970	3	5	5	0	1	2	0	2	3	1	3	3	28	
NCYC 851	2	4	5	0	1	2	0	2	3	0	1	2	22	
NCYC 111	2	3	3	0	0	0	0	2	2	1	3	4	20	
NCYC 2597	2	3	4	0	0	0	0	2	2	1	2	3	19	
NCYC 587	0	2	3	0	0	0	0	0	2	0	2	3	12	
CIDCA 8118	0	2	2	0	0	0	0	2	2	0	1	1	10	
CIDCA 8113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NCYC 2575	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

B.

Número de Spots crecidos en cada condicion usando Melaza de caña de azúcar como sustrato														
Condición	Aerobiosis 37°C			Anaerobiosis 37°C			Aerobiosis pH 2.5 37°C			Aerobiosis Etanol 5% v/v 37 °C			Total	Posición
cepas/ tiempo de incubación	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h		
CIDCA 8111	5	5	5	2	3	4	4	5	5	3	5	5	57,8	1st
NCYC 1425	5	5	5	1	2	4	5	5	4	5	5	5	57,4	2nd
NCYC 3396	5	5	5	0	2	4	5	5	5	5	5	5	57,3	3rd
NCYC 3344	5	5	5	0	2	3	5	5	5	5	5	5	56	4th
CIDCA 9121	5	5	5	0	2	5	4	5	5	3	5	5	55,2	5th
NCYC 2907	5	5	5	0	2	3	4	5	5	5	5	5	54,8	6th
NCYC 2887	5	5	5	0	2	2	4	5	5	5	5	5	53,5	7th
NCYC 111	5	5	5	1	3	5	0	5	5	3	5	5	53	8th
NCYC 1429	5	5	5	0	2	3	4	5	5	3	5	5	52,6	9th
CIDCA 8153	5	5	5	1	2	3	3	5	5	2	5	5	51,6	10th
NCYC 587	5	5	5	1	2	4	0	5	5	4	5	5	51,5	
CIDCA 81105	2	5	5	0	1	5	4	5	5	3	5	5	50,9	
NCYC 006	5	5	5	2	2	2	0	5	5	4	5	5	50,2	
NCYC 100	5	5	5	2	2	2	0	5	5	3	5	5	49,1	
NCYC 179	5	5	5	1	2	3	0	5	5	3	5	5	49,1	
NCYC 851	5	5	5	0	1	1	3	5	5	4	5	5	48,6	
NCYC 2791	4	4	4	1	2	2	3	5	4	4	5	5	48,3	
NCYC 1414	3	5	5	1	2	2	2	5	5	3	5	5	48,2	
NCYC 1426	4	5	5	0	1	2	3	5	5	2	4	5	45,6	
NCYC 970	3	5	5	0	1	1	2	5	5	3	5	5	44,3	
NCYC 2597	5	5	5	0	0	0	3	5	5	2	5	5	43,8	
CIDCA 81104	0	0	0	1	2	4	4	5	5	3	5	5	40,2	
CIDCA 8154	0	0	0	1	2	4	3	5	5	3	5	5	39	
CBS 396	5	5	5	0	0	1	2	5	5	2	2	2	37,3	
CIDCA 8118	2	5	5	1	1	1	1	3	5	0	1	1	28,9	
CIDCA 8113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NCYC 2575	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Figura 1.10: Score obtenido para las diferentes cepas en el ensayo de crecimiento en placa por diluciones seriadas de cepas de *Kluyveromyces.* Los valores se obtuvieron sumando el número de diluciones en las que se observó crecimiento en medio suero de quesería agarizado (**A**) y melaza de caña de azúcar (**B**).

Estas cepas fueron así seleccionadas y sometidas a un nuevo ensayo donde se emplearon los mismos medios agarizados, pero combinando las condiciones de incubación (acidez, presencia de etanol y anaerobiosis) para seleccionar las cepas que tengan la mejor capacidad para desarrollar en

presencia de varias condiciones estresantes a la vez. Los resultados de este ensayo pueden observarse en la Figura 1.11.

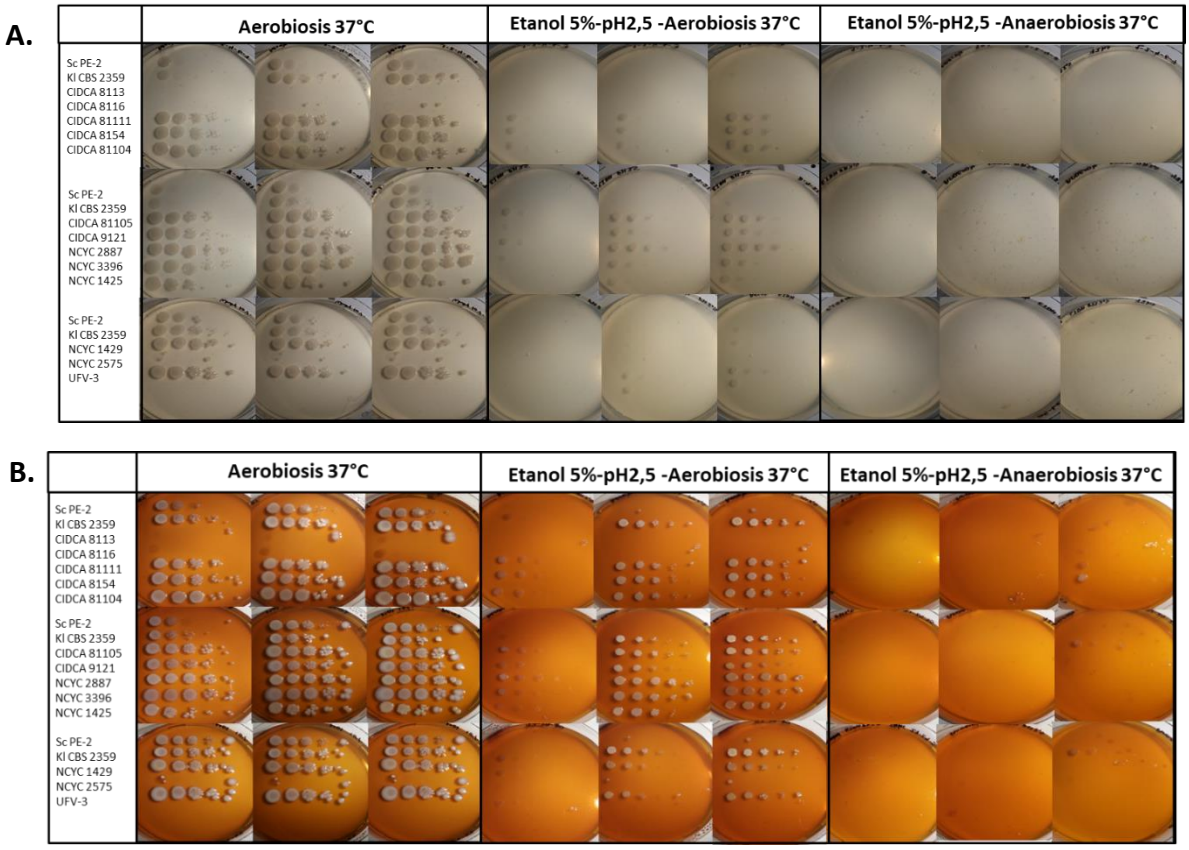


Figura 1.11: Ensayo de crecimiento en placa por diluciones seriadas de cepas de *Kluyveromyces marxianus* (izquierda a derecha DO_{600}: 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} y 10^{-5}) **A.** Crecimiento de diluciones seriadas en medio suero de quesería agarizado **B.** Crecimiento de diluciones seriadas melaza de caña de azúcar agarizado. . Cada fila representa una cepa diferente y cada columna una condición específica de incubación. Se muestran 3 registros fotográficos a los tiempos 24, 48 y 72h de incubación a 37°C para cada condición.

En general podemos decir que las cepas que mostraron buena capacidad de crecimiento frente a un único agente estresor mantuvieron también esta capacidad al enfrentarse a situaciones de combinación de los agentes.

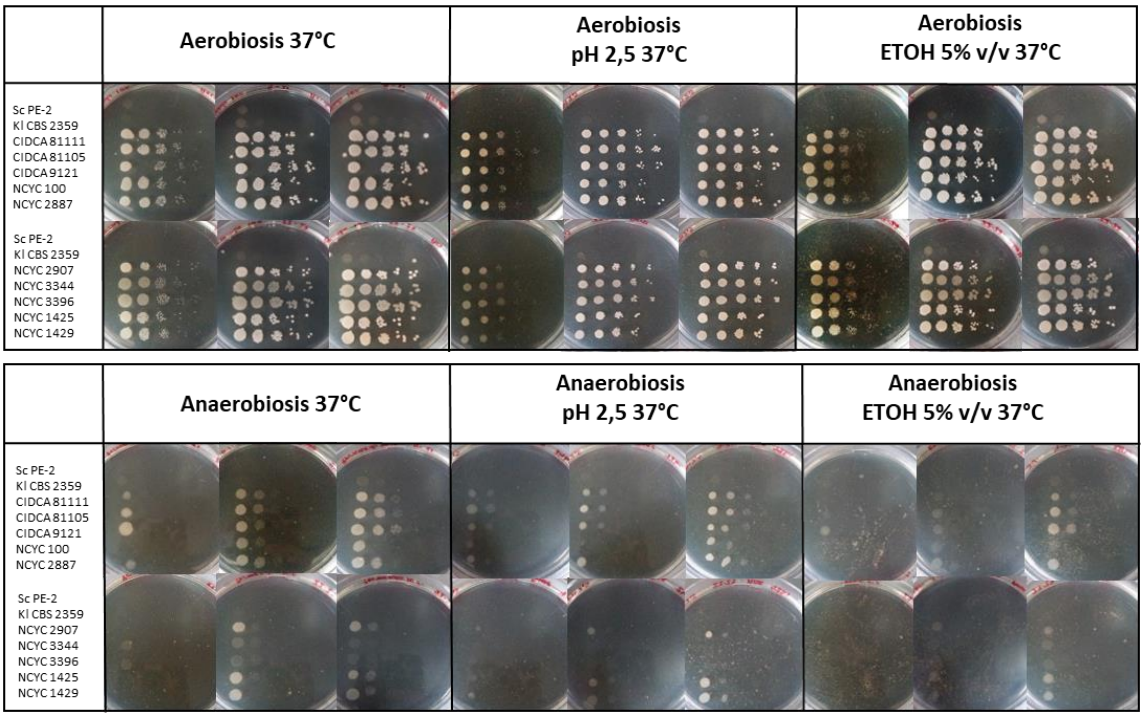
En estos estos ensayos de crecimiento en placa, del total de cepas testeadas se seleccionaron diez por su capacidad de crecimiento en suero de quesería: *K. marxianus* CIDCA 81111, CIDCA 81105, CIDCA 9121, NCYC 100, NCYC 2887, NCYC 2907, NCYC 3344, NCYC 3396, NCYC 1425 y NCYC 1429. A

continuación, para este grupo de cepas se evaluó la capacidad de desarrollo en medio permeado de suero de quesería.

El permeado de suero es un producto secundario derivado de la obtención de concentrados proteicos (WPC) a partir del suero. Este líquido que contiene la mayor cantidad de la lactosa presente en el suero resulta de interés en este trabajo debido a que puede ser utilizado como medio de fermentación en una biorrefinería que plantea la comercialización de proteínas de suero, etanol combustible derivado de la fermentación del permeado y biomasa de levadura probiótica. Para preparar el medio agarizado a base de permeado de suero y para el resto de los ensayos mostrados en este trabajo se utilizó permeado de suero en polvo de ARLA Foods Ingredients S.A. tal como se muestra en el Anexo.

El desarrollo de las cepas seleccionadas en medio permeado de suero agarizado puede observarse en la Figura 1.12, teniendo en cuenta que el color del medio es amarillo claro, pero para una mejor visualización de las colonias se colocó un fondo oscuro para tomar las fotografías.

A.



B.

	Número de Spots crecidas en cada condición utilizando permeado de suero de quesería como sustrato																			
	Aerobic 37°C			Aerobic pH 2.5 37°C			Aerobic Ethanol 5% v/v 37°C			Anaerobic 37°C			Anaerobic pH 2.5 37°C			Anaerobic Ethanol 5% v/v 37°C				
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	Total	Position
CIDCA 9121	5	5	5	3	5	5	3	5	5	2	3	1	2	3	2	0	2	1	57	1st
CIDCA 81111	4	5	5	3	4	5	4	4	4	2	3	1	2	3	2	0	2	0	53	2nd
CIDCA 81105	4	4	4	5	5	5	3	4	4	2	3	1	2	3	2	0	2	0	53	3rd
NCYC 2887	4	5	5	3	5	5	4	5	5	2	2	1	1	3	1	0	1	0	52	4th
NCYC 2907	5	5	5	3	5	5	3	4	4	2	2	0	1	2	1	0	0	0	47	5th
NCYC 3396	5	5	5	3	5	5	3	5	5	2	1	1	0	0	0	0	1	0	46	6th
NCYC 1429	3	5	5	2	4	4	3	5	5	2	1	0	2	2	1	0	1	0	45	7th
NCYC 3344	4	5	5	3	5	5	3	5	5	1	2	1	0	0	0	0	1	0	45	8th
NCYC 1425	3	5	5	3	4	4	3	5	5	2	1	0	0	1	0	0	1	0	42	9th
NCYC 100	3	4	4	3	4	4	3	4	4	1	1	0	1	1	0	0	0	0	37	10th

Figura 1.12: A. Crecimiento en placa por diluciones seriadas de cepas de *Kluyveromyces marxianus* en permeado de suero de quesería agarizado (izquierda a derecha DO_{600}:10^{-1},10^{-2},10^{-3}, 10^{-4} y 10^{-5}). Cada fila representa una cepa diferente y cada columna una condición específica: incubación a pH 2,5 y etanol 5% v/v en aerobiosis o anaerobiosis. Los registros fotográficos fueron tomados luego de 24 h, 48 h y 72 h de Incubación a 37 °C **B.** Score obtenido para las diferentes cepas ensayadas. Los valores se obtuvieron sumando el número de diluciones en las que se observó crecimiento visible.

Las cepas CIDCA 81111, CIDCA 9121, NCYC 2907 y NCYC 1429 fueron seleccionadas especialmente por su desarrollo en permeado de suero agarizado bajo condiciones anaeróbicas. Las cepas CIDCA 81111 y 9121 mostraron buena capacidad de crecimiento en la mayoría de las condiciones testeadas, acumulando los scores más altos del total de cepas analizadas, mientras que las cepas NCYC 2907 y 1429 mostraron buena velocidad de crecimiento en condiciones anaeróbicas y de bajo pH.

Esta primera selección en medio sólido no tuvo en cuenta características productivas de las cepas, a nivel de rendimiento de etanol o bien características probióticas de las mismas, sin embargo, permitió reducir el número de cepas potencialmente capaces de implementarse en una biorrefinería que utilice como medio de fermentación tres desechos industriales altamente contaminantes como son suero de quesería, permeado de suero de quesería o melaza de caña de azúcar.

Evaluación de producción de etanol de levaduras seleccionadas en sistema de fermentación industrial miniaturizado

El siguiente paso fue testear individualmente cada una de estas 4 cepas de *Kluyveromyces marxianus* seleccionadas según su capacidad de producir etanol en un sistema miniaturizado validado que simula la producción de etanol combustible a escala industrial a partir de melaza de caña de azúcar con *Saccharomyces cerevisiae* (Raghavendran et al. 2017). Este sistema permitió el registro del rendimiento de cada cepa de levadura durante ciclos de fermentación consecutivos, una característica que no se puede recrear utilizando sistemas de cultivo convencionales de laboratorio. La biomasa formada al final de un ciclo de fermentación se trató con ácido sulfúrico como medida de sanitización habitualmente usada en las condiciones industriales de biorrefinería aséptica y se utilizó como inóculo para el siguiente, y los parámetros evaluados fueron la viabilidad celular y el rendimiento de etanol.

Se determinó que todas las cepas ensayadas mostraron capacidad para realizar cinco ciclos consecutivos de fermentación en este sistema, con aproximadamente el 99% del consumo de lactosa en cada ciclo de 10 h (Tabla 1.3).

Tabla 1.3: Utilización de lactosa y producción de etanol durante 5 ciclos de fermentación de suero de quesería con cepas de *Kluyveromyces marxianus* y reciclado de células entre ciclos. Los valores numéricos denotan el promedio de duplicados biológicos ± el desvío estándar de la media.

Cepas	Lactosa inicial ($g.L^{-1}$)	Lactosa residual ($g.L^{-1}$)	Etanol producido ($g.L^{-1}$) [a]	Tiempo (horas)
CIDCA 81111	111,6	1,38 ± 0,02	35,5 ± 0,5	10
CIDCA 9121	111,6	1,28 ± 0,01	39,7 ± 0,5	10
NCYC 2907	111,6	1,13 ± 0,01	34,8 ± 0,3	10
NCYC 1429	111,6	1,09 ± 0,03	39,5 ± 0,5	10

[a] Máxima concentración de etanol detectada en los ciclos de fermentación

Dependiendo de la cepa, la concentración final de etanol fue de alrededor del 3,5 al 4,0 % v/v. En la Figura 1.13 (panel A), se puede observar que el rendimiento de etanol varía entre el 80 y el 91% del máximo teórico (0,511 gramos de etanol formado por gramo de equivalente de hexosa consumido), y que la viabilidad de la levadura se mantiene alta (por encima 89%) para *K. marxianus* CIDCA 9121 y NCYC 1429 (Figura 1.13, B). Además, estas dos cepas mostraron las menores variaciones ciclo a ciclo y fueron seleccionadas para estudios posteriores.

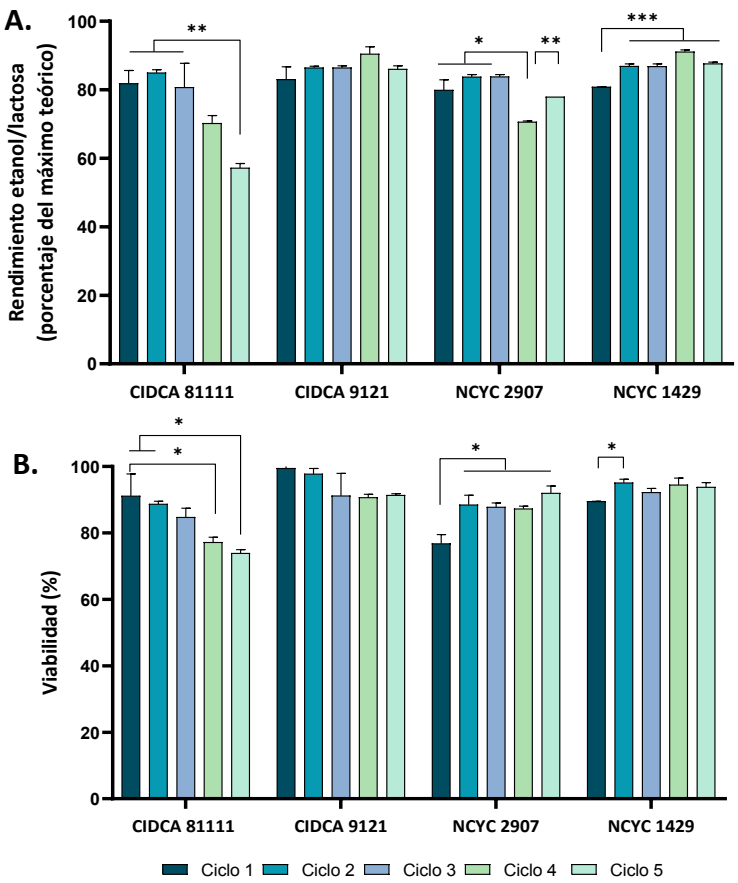


Figura 1.13: (**A**) Rendimiento de etanol y (**B**) viabilidad celular de cepas de *K. marxianus* CIDCA 81111, CIDCA 9121, NCYC 2907 y NCYC 1429 luego de cada ciclo de fermentación en permeado de suero a 34°C en sistema miniaturizado. El rendimiento de etanol esta expresado como porcentaje del rendimiento de etanol máximo teórico para las cuatro cepas de cinco ciclos fermentativos consecutivos. La viabilidad celular luego de cada ciclo fue expresada como porcentaje de levaduras viables sobre el total de levaduras presentes. Se representan el valor medio para las réplicas biológicas independientes. Las diferencias significativas entre ciclos se obtuvieron mediante ANOVA con test de Dunnet de múltiples comparaciones * $p < 0,0332$; ** $p < 0,0021$; *** $p < 0,0002$.

Considerando que la temperatura (30°C o 37°C) y/o la composición del medio (suero o permeado de suero) podrían tener alguna influencia en el rendimiento del proceso, se midieron el rendimiento de etanol y la viabilidad celular después de cada uno de los cinco ciclos de fermentación consecutivos, para las dos cepas seleccionadas (Figura 1.14) y se observó que para ambas cepas, la fermentación a 37 °C dio como resultado un rendimiento de etanol ~10% mayor, en comparación con el rendimiento a 30ºC (Figura 1.14, paneles A y C $p < 0,001$). Este resultado a nivel industrial se traduce en una reducción de costos relacionados con el enfriamiento del fermentador, en términos

de compra y mantenimiento de equipos y uso de agua fría. Asimismo, a 37ºC el rendimiento en etanol fue mayor utilizando permeado como sustrato también para ambas cepas probadas (Figura 1.6, paneles A y C $p < 0,001$). Además, la viabilidad celular estuvo menos influenciada que el rendimiento de etanol por la temperatura (Figura 1.14, paneles B y D), mostrando sólo una mayor viabilidad en el caso de la cepa CIDCA 9121 que creció en suero a 37ºC (Figura 1.14, panel B $p < 0,05$). En consecuencia, se seleccionó la fermentación del permeado de suero a 37°C como condición para experimentos posteriores.

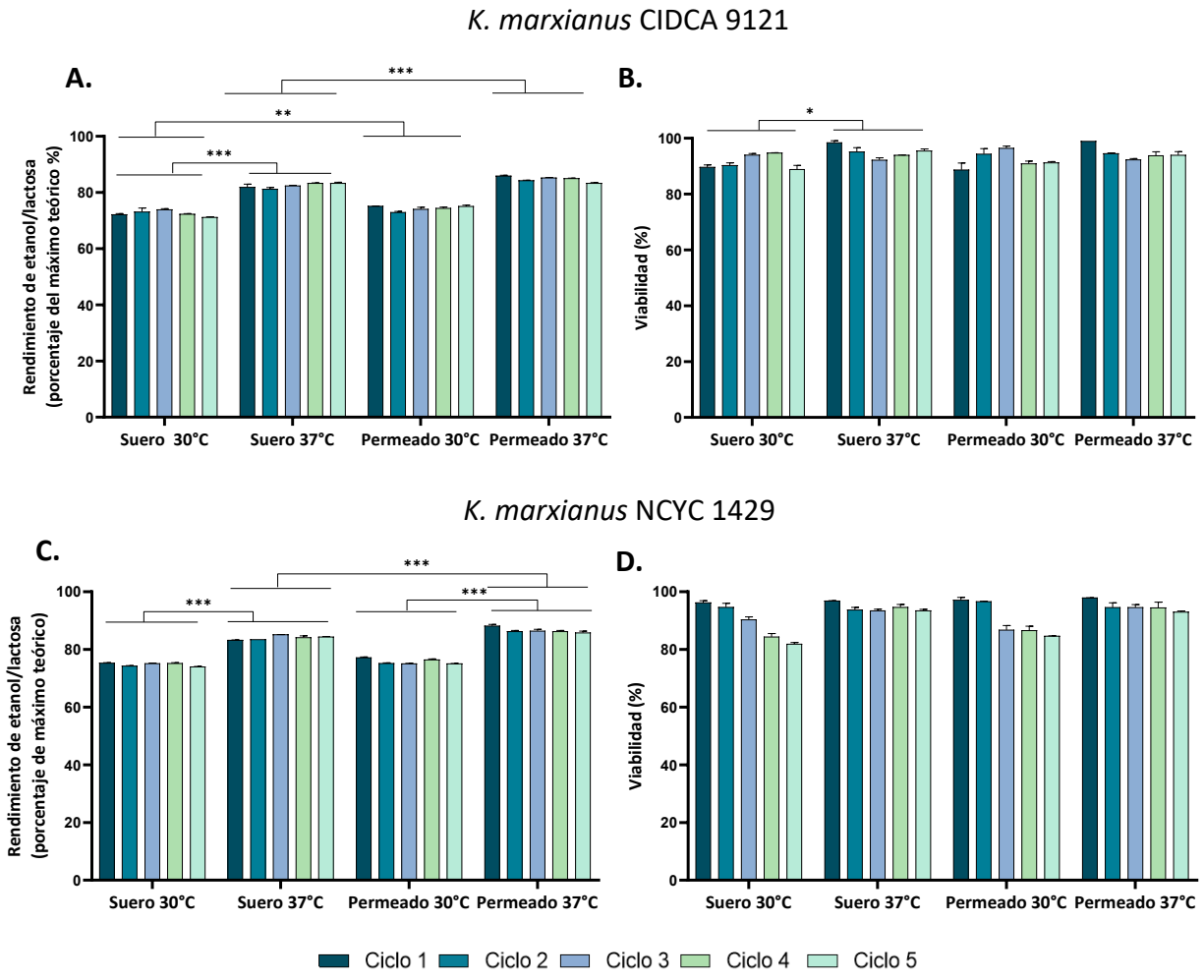


Figura 1.14: Rendimiento de etanol y viabilidad celular de K. marxianus CIDCA 9121 (**A** y **B**) y NCYC 1429 (**C** y **D**) luego de cada ciclo de fermentación a 30 y 37 °C utilizando Suero o Permeado de Suero como sustrato. El rendimiento de etanol esta expresado como porcentaje del rendimiento de etanol máximo teórico para las cuatro cepas en cinco ciclos fermentativos consecutivos. La viabilidad celular luego de cada ciclo fue expresada como porcentaje de levaduras viables sobre el total de levaduras presentes. Se representan el valor medio para las réplicas biológicas independientes. La comparación pareada del rendimiento se evaluó mediante ANOVA con prueba T- Test de Mann Whitney * $p < 0,0332$; ** $p < 0,0021$; ***$p < 0,0002$

Los ensayos mostrados fueron realizados siguiendo el protocolo original publicado por Raghavendran et al (2017), donde las fermentaciones son realizadas en batch alimentado con adición de medio en 3 partes, a fin de evitar altas concentraciones de azúcar y efectos no deseados de la represión de la glucosa que se sabe que afectan a *S. cerevisiae*. No obstante, se conoce que varias cepas de la especie *K. marxianus* no presentan efecto "cabtree" y que además el medio utilizado presenta una concentración inicial que contiene un 50% menos de azúcares totales en comparación a melaza de caña de azúcar utilizada en la producción de etanol con *S. cerevisiae*. Teniendo en cuenta estos dos aspectos, se decidió evaluar los efectos de usar fermentación en cultivo batch, observándose que la viabilidad celular de *K. marxianus* CIDCA 9121 no se vio afectada y se mejoró el rendimiento de etanol ($p < 0,001$), lo que indica que el proceso también se puede llevar a cabo utilizando este método más simple (Figura 1.15).

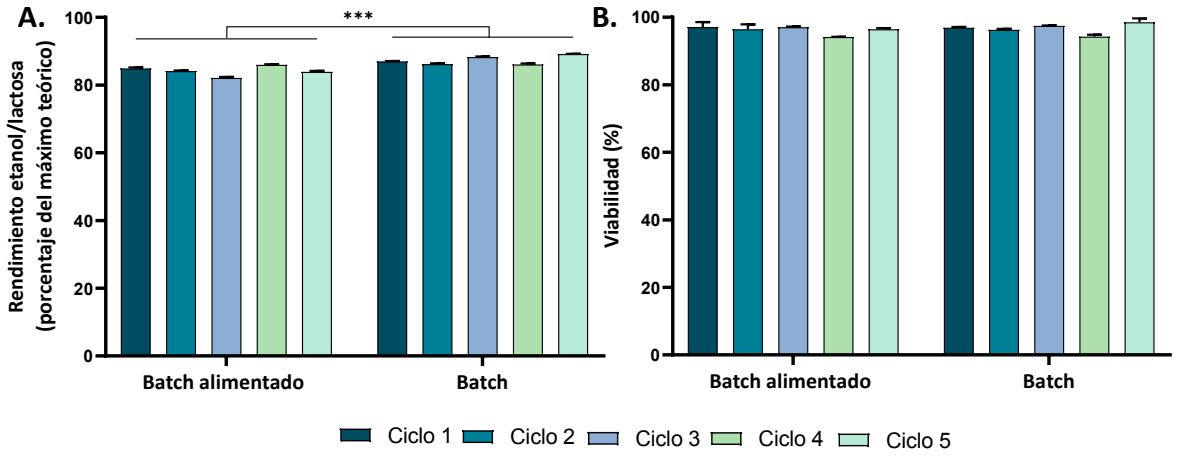


Figura 1.15: Rendimiento de etanol (**A**) y viabilidad celular (**B**) de *K. marxianus* CIDCA 9121 después de cada ciclo de fermentación utilizando permeado como sustrato en procesos batch y batch alimentado. Rendimiento de etanol como porcentaje del máximo teórico durante los cinco ciclos de fermentación. La Viabilidad celular durante los cinco ciclos medida como el porcentaje de células viables en una población de células viables y no viables. Se presentan los valores medios de réplicas biológicas independientes. La comparación pareada del rendimiento obtenido en diferentes condiciones se evaluó mediante el test T de Mann Whitney. ***$p < 0,0002$.

De esta manera, se pudo evidenciar que las cepas seleccionadas, y en particular *K. marxianus* CIDCA 9121, fueron capaces de producir etanol en medio a base de suero de quesería o permeado de lactosuero con un alto rendimiento incluso luego de cinco ciclos de fermentación con reciclado de células entre ciclos, obteniendo valores de concentración final de etanol comparables a los

obtenidos por otros autores. Por ejemplo, Carvhalo et al. (2021) compilaron información de diversos estudios sobre la producción de etanol a partir de suero de quesería utilizando distintas cepas de *K. marxianus*, observando que los valores de etanol varían significativamente, oscilando entre 0,58% y 10,3% v/v. Esta variabilidad se atribuye principalmente a la concentración inicial de lactosa en el medio (que va desde 35 g/L hasta 200 g/L), el tiempo de fermentación (de 8 a 60 horas) y el tipo de cultivo, ya sea células inmovilizadas, batch o continuo. Koushki et al. (2012) llevaron a cabo ensayos comparativos de fermentación utilizando suero de quesería crudo (con una concentración de lactosa de 48 g/L) y suero concentrado (con una concentración de lactosa de 98 g/L) en diversas condiciones de temperatura y pH, y observaron que bajo condiciones óptimas de cultivo (pH 4,8 y 30°C), se alcanzó una producción de etanol del 4,8% v/v para una cepa de *K. marxianus* en medio con suero concentrado. Siguiendo esta línea, Murari et al. (2019) realizaron un análisis de optimización de condiciones para la producción de etanol a diferentes escalas utilizando la cepa *K. marxianus* URM 7404 y obtuvieron valores máximos de 2,8 % v/v de etanol después de 10 horas de cultivo a 33°C y pH 5, partiendo de una concentración inicial de lactosa en suero de 60 g/L.

Cabe mencionar que a nivel industrial y comercial la destilación de etanol es económicamente rentable a partir de valores que superen los 70 g/L, en este sentido, los valores de etanol obtenidos aún están por debajo de este requisito. Algunos investigadores han logrado obtener valores superiores a 7%v/v mediante la utilización cultivos con levaduras inmovilizadas, aplicación de ingeniería evolutiva (Karim et al., 2020), mediante la suplementación del medio base con factores de crecimiento u otras fuentes de nitrógeno o adición de melaza de caña de azúcar al medio inicial (Carvhalo et al., 2021), o bien trabajando con cultivos mixtos de *K. marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Saratale et al., 2017; Beniwal et al., 2018).

Ensayo de caracterización de respuesta inmunomoduladora de inflamación intestinal en células Caco-2 ccl20: luc *in vitro*

Hasta el momento, la selección de levaduras candidatas a ser utilizadas en una biorrefinería a base de suero de quesería para la obtención de proteínas de suero, etanol combustible y biomasa probiótica tuvo en cuenta solo los aspectos de capacidad de desarrollo y producción de etanol en los medios industriales propuestos. Sin embargo, como se sabe que la capacidad probiótica puede

verse modificada por las condiciones de cultivo, es de vital importancia validar que la biomasa de levadura obtenida luego del proceso fermentativo conserve sus propiedades.

Un microorganismo probiótico puede presentar diferentes mecanismos o funciones biológicas que mejoren la salud del hospedador, y una de ellas puede ser la modulación de la respuesta inflamatoria innata a nivel intestinal. Para evaluar la actividad antiinflamatoria de las cepas de *K. marxianus* se utilizó un sistema reportero de células intestinales Caco-2 ccl20:luc (Rumbo et al. 2004, Romanin et al., 2010) donde el gen de la luciferasa fue transfectado en estable bajo control del promotor de la quimoquina proinflamatoria CCL20. La expresión de esta proteína responde al estímulo con flagelina aislada de *Salmonella* (FliC), por lo tanto, existe una correlación directa entre el aumento de la actividad de la luciferasa y el aumento de la respuesta inflamatoria, como lo describe Nempont et al (2008).

Se estudió la actividad inmunomoduladora *in vitro* de las 4 cepas de levadura seleccionadas (CIDCA 81111, CIDCA 9121, NCYC 2907 y NCYC 1429) crecidas en permeado de suero, observándose que todas ellas presentan una fuerte capacidad para reducir la actividad luciferasa de las células Caco-2 a niveles basales (Figura 1.16).

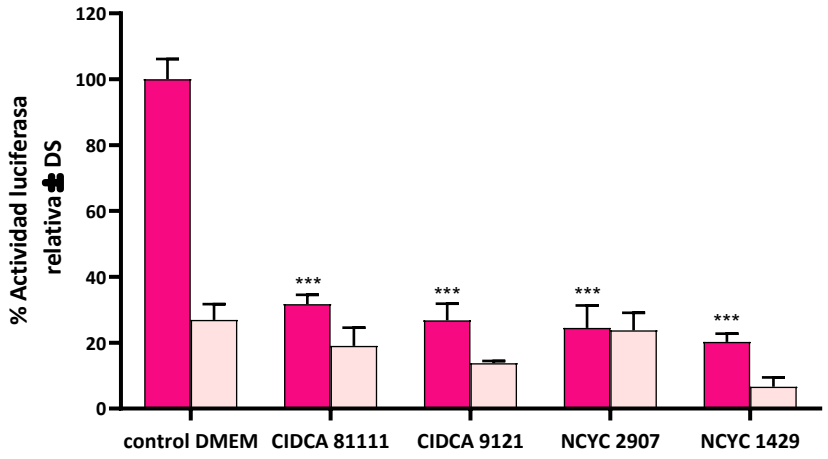


Figura 1.16: Porcentaje de activación de la expresión de luciferasa en células Caco-2 CCL20: luc estimuladas con flagelina previamente tratadas con suspensión de levadura CIDCA 81111, CIDCA 9121, NCYC 2907, NCYC 1429 crecidas en medio permeado de lactosuero 10% p/v. Células preincubadas con medio DMEM fueron utilizadas como control. Las barras (○) indican la condición basal y las barras (●) indican condición estimulada con FliC 1µg/ml. Diferencias significativas (*** p<0,0002) respecto al control.

Asimismo, se evaluó la actividad inmunomoduladora de la cepa *K. marxianus* CIDCA 9121 sometida a las condiciones de una fermentación en el entorno industrial miniaturizado detectándose que se mantiene luego de 4 ciclos fermentativos (Figura 1.17).

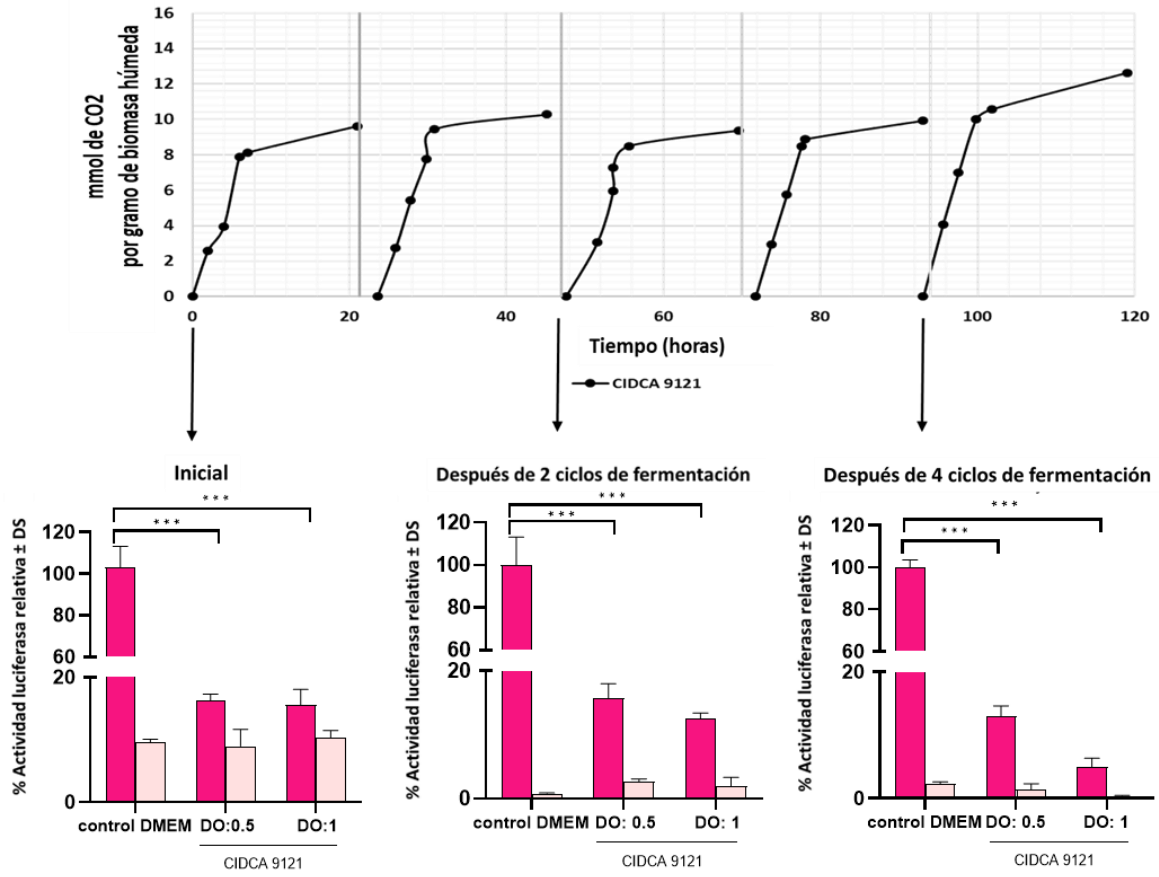


Figura 1.17: Porcentaje de activación de la expresión de luciferasa en células Caco-2 CCL20:luc estimuladas con flagelina previamente tratadas con suspensión de levadura CIDCA 9121 después de 0, 2 y 4 ciclos de fermentación de permeado de suero a 37 °C en un sistema miniaturizado. Células preincubadas con medio DMEM fueron utilizadas como control. Las barras (▫) indican la condición basal y las barras (▪) indican condición estimulada con FliC 1µg/ml. La progresión de la fermentación en cada ciclo fue monitoreada mediante la generación de CO_2. Los resultados mostrados son la media de triplicados independientes. Diferencias significativas (*** p<0,0002) respecto al control.

Ensayo de Resistencia al pasaje gastrointestinal *in vitro*

Para ejercer el efecto inmunomodulador sobre el epitelio intestinal, la levadura debe sobrevivir al pasaje por el tracto gastrointestinal, por ello se evaluó la resistencia de las cepas *K. marxianus* CIDCA 9121, NCYC 1429, CIDCA 81111 y NCYC 2907 crecidas en permeado de suero y también de

las mismas post ciclo de fermentación para simular el escenario de la biorrefinería propuesta. Las cuatro cepas mostraron buena tolerancia a las condiciones gastrointestinales *in vitro* (Figura 1.18). Existen en bibliografía diferentes protocolos para evaluar la sobrevida de microorganismos a las condiciones gastrointestinales *in vitro* (Pennacchia et al., 2008; Diosma et al., 2014; Gil-Rodríguez et al., 2015; Fadda et al.,2017; Moradi et al., 2018). A esto se le debe sumar la respuesta cepa dependiente, el medio de cultivo donde fue crecida, el ambiente de donde fue aislada la cepa de levadura, entre otros. Pennacchia et al. (2008) establecieron un porcentaje de supervivencia del 70% para seleccionar cepas de levadura como potenciales probióticos. En este estudio, el porcentaje de sobrevida varió entre un 74% para la cepa NCYC 2907 y un 80% en el mejor de los casos, para la cepa CIDCA 9121. De todos modos, las cepas redujeron sus recuentos en solo un logaritmo (cepas CIDCA 81111 y CIDCA 9121) o 1,5 logaritmos (cepas NCYC 2907 y NCYC 1429) demostrando que podrían alcanzar en el intestino una concentración adecuada para ejercer su acción benéfica si se ingieren en dosis adecuadas.

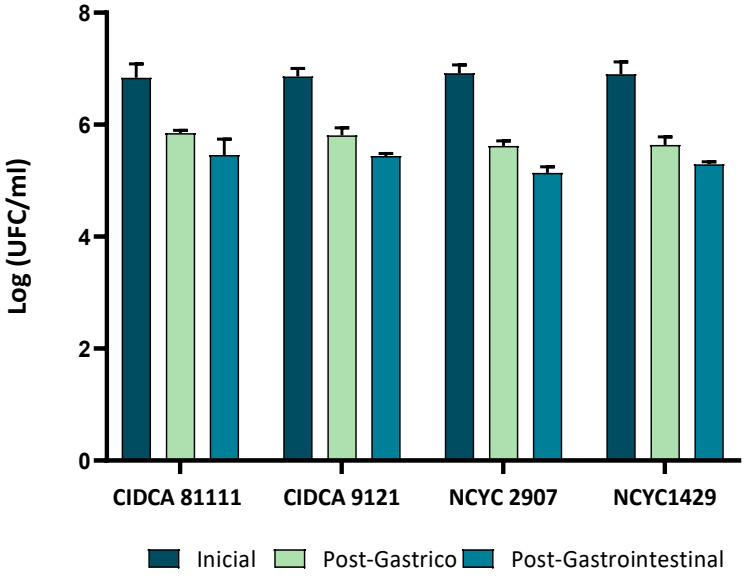


Figura 1.18: Viabilidad de cepas de *K. marxianus* después de cinco ciclos consecutivos de fermentación en un proceso industrial miniaturizado, posteriormente sometido a un tratamiento gastrointestinal simulado. Supervivencia de CIDCA 81111, CIDCA 9121, NCYC 2907 y NCYC 1429 después del paso por condiciones gástricas simuladas (gris claro) e intestinales posteriores (gris). Los recuentos bacterianos iniciales se muestran en barras negras. Los resultados se expresan como media ± SEM de dos experimentos independientes. UFC/mL: unidades formadoras de colonias por mililitro.

Los ensayos descriptos anteriormente fueron realizados en colaboración con un grupo de investigación a cargo de Prof. Andreas Gombert en el Laboratorio de Ingeniería Metabólica y Bioprocesos de la Universidad de Campinhas, Sao Pablo, Brasil quienes aportaron sus conocimientos en el área de ingeniería metabólica microbiana en especial en el proceso de obtención de etanol a partir de melaza de caña de azúcar y levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*. Esto explica la metodología de trabajo utilizada al comienzo de este capítulo y el modelo a seguir para plantear el proceso de producción de etanol no solo aplicado a melaza de caña de azúcar sino también a suero de quesería. Luego decidimos poner el foco en la utilización primariamente de suero de quesería teniendo en cuenta el impacto de ese subproducto de la industria alimentaria en Argentina y en particular en la región bonaerense, donde fue desarrollado este trabajo de tesis.

Resistencia al pasaje gastrointestinal *in vivo*

Debido a su buen desempeño en los ensayos de crecimiento y producción de etanol en suero y permeado de suero de quesería, la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 fue seleccionada para realizar los ensayos de caracterización probiótica en modelos animales.

Para evaluar la resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal se administró a ratones una suspensión de 1,33 ± 0,95 10^7 UFC/ml de *K. marxianus* CIDCA 9121 obtenida después de cinco ciclos de fermentación simulando el proceso industrial. Previo a realizar este ensayo se evaluó la viabilidad de la levadura en el agua de bebida tal como se les administró a los ratones y se corroboró que la levadura se mantiene viable en agua de bebida incluso con 7 días de almacenamiento de 4°C.

En el experimento *in vivo* la levadura fue administrada durante 7 días y se determinó su concentración en heces. Los resultados confirmaron que la levadura CIDCA 9121 presenta capacidad para resistir condiciones gastrointestinales ya que se encontró en heces en concentración de 1,12 ± 0,44 10^7 UFC/g, 2,22 ± 1,9 10^7 UFC/g y 2,26 ± 0,8 10^7 UFC/g al cabo de dos, tres y siete días de administración oral, respectivamente.

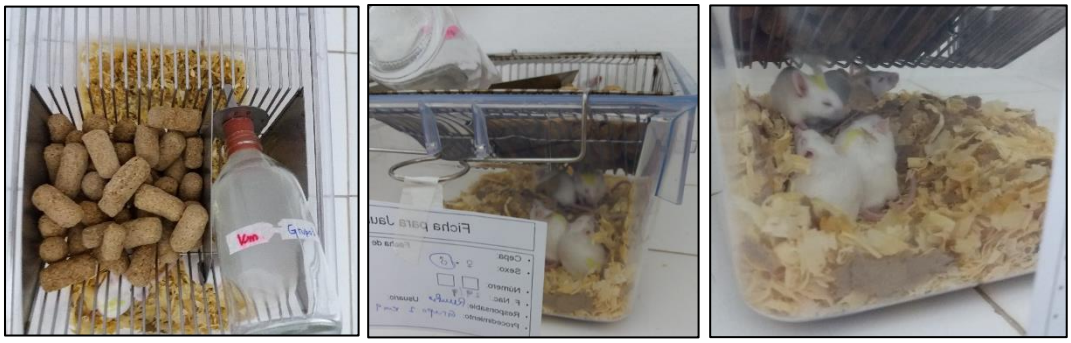


Figura 1.19: Imágenes de Ensayo de resistencia de pasaje por tracto gastrointestinal en ratones de la levadura CIDCA 9121 luego de ser sometida a cinco ciclos de fermentación en sistema industrial miniaturizado.

Finalmente se analizó el contenido intestinal de diferentes porciones del intestino de ratones para determinar la distribución de la levadura, detectándose una alta concentración en las porciones distales (íleon y colon). Además, cabe destacar que no se observó translocación a los compartimentos sistémicos, ya que no se recuperaron levaduras de hígado ni bazo, lo cual pone en evidencia la inocuidad de la administración oral de la cepa.

Evaluación de la capacidad moduladora de respuesta inflamatoria en un modelo de colitis inducido por TNBS

Uno de los modelos más utilizados de inflamación intestinal en ratones es la inducción de colitis por la administración intrarrectal de TNBS. Este modelo experimental ha sido aceptado como modelo de enfermedad de Crohn, ya que el mismo genera inflamación en la mucosa con un perfil de activación tipo Th1 y una excesiva producción de citoquinas proinflamatorias como IFN-γ, TNF-α, IL-1β e IL-6. La principal lectura de este modelo es la histopatología del recto. El daño tisular se evalúa mediante un score que considera el edema en la capa submucosa, el infiltrado inflamatorio, las alteraciones en la mucosa y el daño epitelial.

Para evaluar la capacidad de la cepa CIDCA 9121 obtenida en un entorno industrial miniaturizado de mitigar el daño tisular en un modelo de colitis aguda, se les administró a ratones BALB/c una suspensión de la levadura obtenida después de cinco ciclos de fermentación en permeado de suero. La suspensión de levadura se preparó fresca diariamente. Los ratones de grupo control recibieron

agua normal y ambos grupos recibieron comida normal durante la experiencia. Después de 24 y 48 h de instilación TNBS, se observó una disminución en el peso corporal en todos los animales siendo

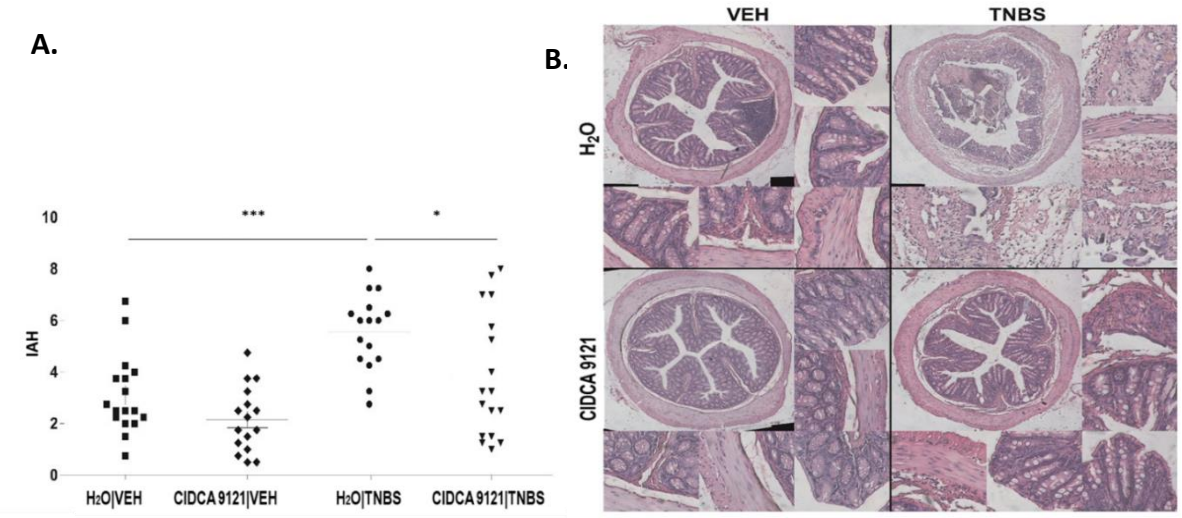


Figura 1.20: Los ratones se trataron con suspensiones de levadura o agua 4 días antes de la instilación de TNBS o vehículo (VEH) y 48 h después se recogió tejido para análisis histopatológico. Se muestran los resultados de 18 animales por grupo. (**A**)IAH: Índice de actividad histopatológica asignado a diferentes grupos experimentales. Las diferencias significativas entre grupos se indican en el gráfico. (**B**) Fotomicrografía de una sección transversal teñida con hematoxilina y eosina del cólon distal de un ratón representativo de cada grupo experimental. La comparación pareada del rendimiento obtenido en diferentes condiciones se evaluó mediante la prueba T con la prueba de Mann Whitney. *p < 0,0332; ***p < 0,0002.

más moderada en los tratados con levadura. Esta diferencia se correlaciona con el daño histopatológico presente en el colon, que es el "gold standard" para evaluar la protección en este modelo. Los animales que recibieron el tratamiento con levadura mostraron menos daño en el epitelio y menos infiltración en la submucosa en comparación con el grupo TNBS/agua (p <0,04, Figura 1.20).

Estos resultados indican que la administración de CIDCA 9121, incluso después de haber sido cultivada en condiciones simuladas de producción industrial de etanol, protege contra el daño histopatológico inducido por TNBS en un modelo animal agudo de colitis (p <0,05).

Adhesión de levaduras a células de epitelio intestinal Caco2/TC7

La capacidad de adhesión al epitelio intestinal, aunque sea temporal es considerado un criterio de selección de cepas probióticas debido a que la adherencia está asociada con un mayor tiempo de residencia en el tracto gastrointestinal y una mayor posibilidad de ejercer efectos

inmunomoduladores, así como de inhibir la adhesión de patógenos al epitelio intestinal (Xu et al., 2009; Macaferri et al., 2012; Fadda et al., 2017). Por este motivo se caracterizó la adhesión de cepas de *Kluyveromyces marxianus* seleccionadas crecidas en medio YPD y permeado de suero de quesería a células Caco-2/TC7. La cepa CIDCA 8154 se incluyó como referencia, por estar caracterizada previamente por nuestro grupo (Romanin et al., 2010; Diosma et al., 2014).

Tabla 1.4: Adhesión de *K. marxianus* CIDCA 8154 y CIDCA 9121 crecidas en medio YPD y en medio permeado de lactosuero al 10% p/v células Caco-2/TC7. Adhesión (%): (células adheridas/células agregadas por fosa) x100. Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$).

	Inóculo (UFC/ml)	Adhesión (UFC/ml)	% Adhesión	
Levaduras crecidas en YPD				
K. marxianus CIDCA 8154	8,5±2,8 x10^6	1,08±0,2 x10^6	12,3	a
K. marxianus CIDCA 9121	1,28±1,27 x10^6	2,02±0,4 x10^6	15,0	a,b
K. marxianus CIDCA 81111	7±0,35 x10^6	9,31±0,26 x10^5	13,3	a,b
K. marxianus NCYC 2907	ND	ND	ND	
K. marxianus NCYC 1429	ND	ND	ND	
Levaduras crecidas en permeado				
K. marxianus CIDCA 8154	2,8±0,6 x10^6	9,42±0,6 x10^5	33,6	c
K. marxianus CIDCA 9121	6,67±0,14 x10^6	2,75±0,14 x10^6	41,3	c
K. marxianus CIDCA 81111	1,83±0,69 x10^6	7,19±1,15 x10^5	39,2	c
K. marxianus NCYC 2907	7,5±1,13 x10^6	1,35±0,31 x10^6	18,1	a,b
K. marxianus NCYC 1429	5,67±0,57 x10^6	1,43±0,12 x10^6	25,3	b

Todas las levaduras ensayadas mostraron capacidad de adherirse a células Caco-2/TC7 en un 12-41%. Como se observa en la Tabla 1.4, la capacidad de adhesión de las levaduras varió significativamente tanto a nivel de cepa como de acuerdo con el medio de cultivo en el que fueron crecidas, registrándose los valores más bajos cuando las cepas son crecidas en YPD.

Autores como Kumura et al. (2004) y Londero et al. (2012) ya habían explorado la capacidad de adhesión de levaduras aisladas de kefir entre ellas cepas de *K. marxianus* obteniendo valores del 4 al 8%. Estos valores fueron coincidentes con trabajos más recientes como Fadda et al., (2017) donde se ha evaluado la capacidad de adhesión de cepas *Kluyveromyces* aisladas de queso sardo, y en particular, cepas de *K. marxianus* mostraron valores de adhesión de 4-13%, similares a los obtenidos en este trabajo cuando las cepas fueron crecidas en medio YPD.

Cabe destacar que el porcentaje de adhesión de *K. marxianus* CIDCA 8154, CIDCA 9121 y CIDCA 81111 aumentó significativamente cuando estas cepas fueron crecidas en permeado de lactosuero, alcanzando un máximo de 41% para CIDCA 9121, que resulta superior al 26,7% descripto para la cepa probiótica comercial *Saccharomyces boulardii* (Fernández-Pacheco et al., 2021). Esto resulta

relevante para este estudio, debido a que simula el escenario más parecido al que se daría en una biorrefinería donde la biomasa de levadura probiótica se obtendría por crecimiento en un medio a base de permeado de lactosuero.

Capacidad de autoagregación de levaduras y co-agregación con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CIDCA 101

Aunque se ha demostrado que la capacidad de adhesión de los probióticos a la mucosa intestinal interfiere en la adherencia de patógenos a través de mecanismos de exclusión competitiva (Jankowska et al., 2008), se ha observado que incluso las cepas de levadura con baja capacidad de adherencia podrían ser efectivas en la reducción de la adhesión de bacterias patógenas tales como *Salmonella* y *Eschericchia coli* mediante otros mecanismos de acción que se vinculan a la captura del microorganismo patógeno en la superficie de la levadura (Tiago et.al 2012). Es por este motivo que resultó de interés profundizar en el estudio de la capacidad de agregación de las levaduras. Tal como se observa en la Figura 1.21, la densidad óptica de las suspensiones de levaduras en PBS disminuyó en el tiempo, demostrando que ambas cepas de *K. marxianus* CIDCA 9121 y CIDCA 8154 tienen capacidad de autoagregar al cabo de una hora.

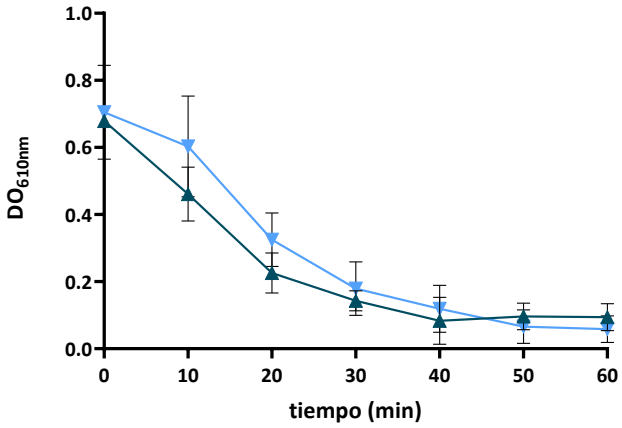


Figura 1.21: Cinéticas autoagregación de *K. marxianus* CIDCA 9121 (Δ) y CIDCA 8154 (Δ).

El tipo de interacción célula-célula, denominada autoagregación se define como la capacidad de adhesión entre células del mismo tipo, mientras que la co-agregación se caracteriza por el reconocimiento específico y adherencia de diferentes especies de microorganismos entre sí (Tomičić et al., 2022). Este proceso depende de varios aspectos, como las propiedades fisicoquímicas de la superficie celular, la presencia de Ca^{+2} o manosa en el medio (Touhami et al., 2003), la presencia de cualquiera de los genes FLO que codifican proteínas similares a las lectinas

conocidas como adhesinas, zimolectinas o floculinas (Van Mulders et al., 2010) o bien a la fase de crecimiento. La autoagregación está mediada por moléculas de la superficie celular y, por tanto, se ve afectada por la diferente composición de la pared celular y/ o apéndices de cada cepa (Touhami et al., 2003), es por esto que podría esperarse que diferentes especies o incluso cepas de levadura tengan un comportamiento de agregación distinto según se modifiquen alguno de los aspectos mencionados.

Al estudiar la coagregación de *K marxianus* con *S.* Enteritidis, no se observaron diferencias en el descenso de la densidad óptica para las suspensiones de levaduras en presencia o ausencia del patógeno al cabo de 1 hora, lo cual podría atribuirse a la sedimentación de las levaduras y no a la formación de coagregados con *Salmonella* (Figura 1.22).

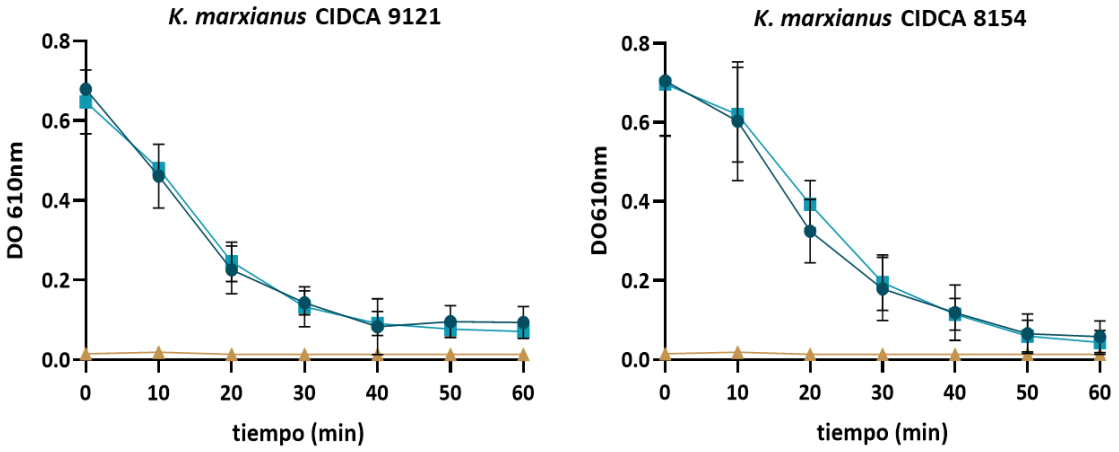


Figura 1.22: Cinéticas de co-agregación de *K. marxianus* CIDCA 9121 y CIDCA 8154 con *S.* Enteritidis (●). Además, se muestran las cinéticas de autoagregación de las levaduras (■) y de *S.* Enteritidis (▲)

Sin embargo, no puede descartarse la existencia de coagregación entre estos microorganismos a tiempos más prolongados. Muchos trabajos han evaluado el efecto de coagregación entre cepas de levaduras, entre ellas *S.boulardii* y diferentes patógenos tales como *S.aureus, E.coli* y *S. typhimurium* y encontraron que la capacidad de coagregación aumenta al cabo de 24h de incubación (Chelliah et al., 2021). Pese a esto, este trabajo se focalizó en la evaluación de la interacción probiótico-patógeno durante una hora para simular lo que ocurre durante la incubación de los mismos en ensayos de evaluación de la asociación-invasión de *Salmonella* a células Caco-2 TC/7.

Evaluación del efecto antagónico de levaduras sobre la asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis

La asociación e invasión de *Salmonella* spp. al epitelio intestinal representan un paso crítico para iniciar la infección. Se evaluó la capacidad de cepas de levadura *K. marxianus* para proteger el epitelio intestinal contra el daño causado por *S*. Enteritidis mediante tres estrategias: la presencia de células de levadura, el pretratamiento de *Salmonella* con levadura y el pretratamiento de *Salmonella* con sobrenadante de cultivo de levaduras libre de células.

Se adicionaron cultivos de levaduras en permeado de lactosuero a células Caco-2/TC7. Luego de una incubación de 1 h a 37 °C se agregó *Salmonella* Enteritidis CIDCA 101 y se evaluó su asociación e internalización a los enterocitos.

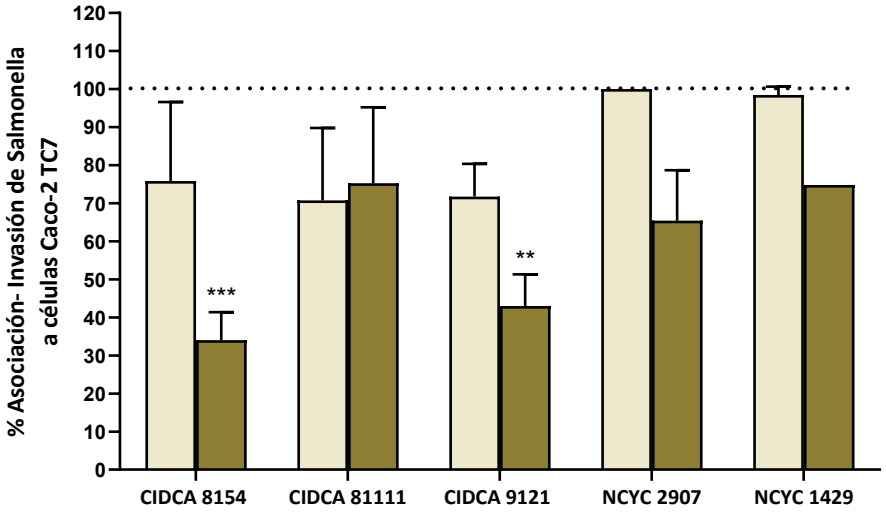


Figura 1.23: Efecto de la presencia de levaduras *Kluyveromyces marxianus* sobre la asociación e invasión de *Salmonella enterica serovar.* Enteritidis CIDCA 101 a células Caco-2/TC7. Porcentaje de S*almonella* asociada (◦) e internalizada (•) a monocapas de células Caco-2/TC7 tratada 1 h con suspensión de levaduras *K. marxianus* CIDCA 8154, CIDCA 81111, CIDCA 9121, NCYC 2907 y NCYC 1429 crecidas en permeado de suero. La línea punteada indica el porcentaje de asociación e invasión obtenidos en fosas control. Los valores corresponden al promedio de dos ensayos independientes. Las diferencias significativas ** $p < 0,0021$; ***$p < 0,0002$ respecto al control.

Uno de los mecanismos a través del cual los probióticos pueden proteger al hospedador frente a patógenos intestinales es mediante el denominado “efecto barrera” haciendo referencia al proceso mediante el cual los microorganismos asociados a la monocapa impiden el contacto del patógeno con las células epiteliales evitando así su asociación e invasión. Se observó que solo las cepas CIDCA 8154 y CIDCA 9121 disminuyeron significativamente la invasión de *Salmonella* a células Caco-2/TC7

(Figura 1.23). El mismo ensayo fue realizado con las levaduras crecidas en medio YPD no detectándose diferencias significativas en el comportamiento (Figura 1.24)

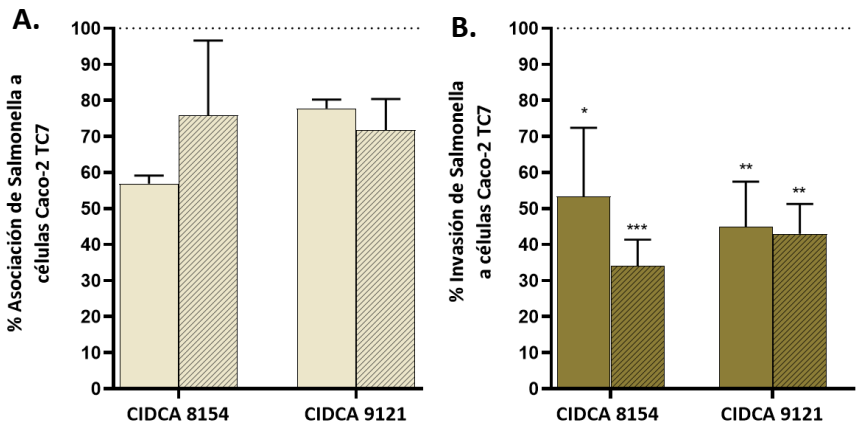


Figura 1.24: Porcentaje de S*almonella enterica* serovar. Enteritidis CIDCA 101 asociada (**A**) e internalizada (**B**) a monocapas de células Caco-2/TC7 sin tratamiento (control) y monocapa tratada 1 h con suspensión de levaduras *K. marxianus* CIDCA 8154, CIDCA 9121 crecidas en YPD (barras lisas)y crecidas en permeado. Los valores corresponden al promedio de dos ensayos independientes. Las diferencias significativas *p< 0,0332; ** p < 0,0021; ***p < 0,0002 respecto al control.

Los probióticos también pueden interaccionar superficialmente con los patógenos antes de su unión al epitelio intestinal afectando su asociación por interferencia con receptores o estructuras de adhesión implicadas en el proceso. Se estudió por consiguiente si la incubación previa de *Salmonella* Enteritidis con *K. marxianus* CIDCA 9121 y CIDCA 8154 afecta la capacidad del patógeno de asociarse y/o invadir la monocapa de células Caco-2/TC7. Para esto, se preincubó *Salmonella* durante 1 h a 37°C con una suspensión de levadura y luego la mezcla se colocó sobre la monocapa.

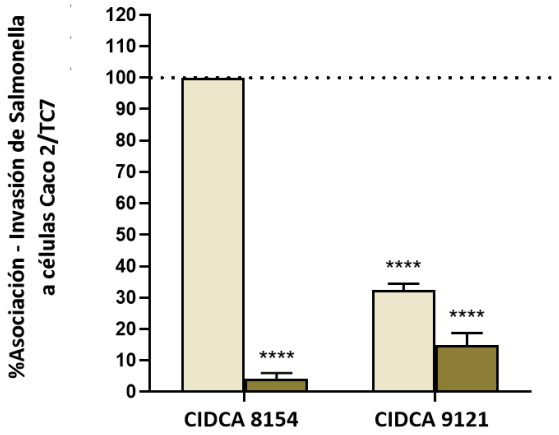


Figura 1.25: Efecto de la co-incubación de *Salmonella* Enteritidis con levaduras previo al encuentro con enterocitos. Porcentaje de S*almonella* asociada (◦) e internalizada (•) a monocapas de células Caco-2/TC7 luego de ser preincubada con una suspensión de levadura *K.marxianus* CIDCA 8154 y CIDCA 9121 durante 1h. *Salmonella* preincubada con PBS fue usada como control (línea punteada). Los valores corresponden al promedio de dos ensayos independientes. Las diferencias significativas ****p < 0,0001 respecto al control.

Se pudo observar que la co-incubación de *Salmonella* con una suspensión de levadura CIDCA 8154 y CIDCA 9121 previa al contacto con la monocapa de células intestinales, disminuye notablemente el proceso de invasión del patógeno a los enterocitos en un 96 y 85 %, respectivamente (Figura 1.25).

Para evaluar el efecto de los sobrenadantes de cultivos de levaduras sobre la asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis, se preincubó una suspensión de 10^7 UFC/ml del patógeno (misma concentración que se utilizó en los ensayos anteriores) con sobrenadantes obtenidos por centrifugación de cultivos de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 y CIDCA 8154 crecidas 24 h a 30°C en permeado de lactosuero 10% p /v (Figura 1.26).

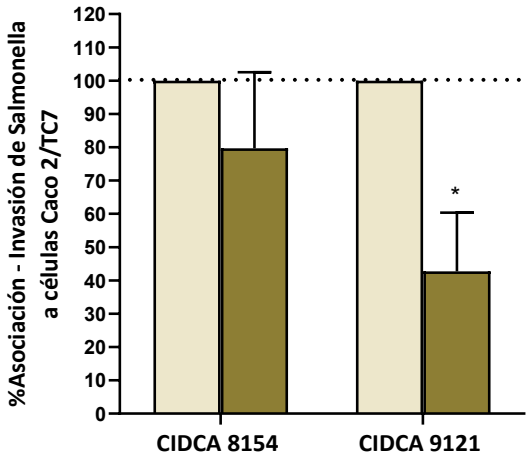


Figura 1.26: Efecto de los sobrenadantes de cultivos de levaduras crecidas en permeado de suero sobre la asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis a células Caco-2/TC7. Porcentaje de asociada (•) e internalizada (•) a monocapas de células Caco-2/TC7 luego de ser preincubada con sobrenadantes de cultivos independientes de *K. marxianus* CIDCA 8154 y CIDCA 9121 durante 1 h. *Salmonella* preincubada con PBS fue usada como control (línea punteada). Los valores corresponden al promedio de dos ensayos independientes. Las diferencias significativas * p< 0,0332 respecto al control.

Tal como se observa, la pre-incubación de *Salmonella* con los sobrenadantes de cultivo de las levaduras no afectó la asociación del patógeno a las células Caco-2/TC7, pero si disminuyó la invasión cuando se preincubó con el sobrenadante de *K. marxianus* CIDCA 9121 (Figura 1.26).

Se ha descripto que *S. boulardii* ejerce un biocontrol contra *Clostridium difficile* a través de actividad proteolítica e impedimento estérico (Tasteyre et al., 2002), otros estudios han demostrado la capacidad de *S. boulardii* para unirse a patógenos bacterianos asociado con la presencia de mananos y polisacáridos de la pared celular de la levadura (Tiago et al. 2012). Por otro lado, Fu et al. (2023) sugieren que la actividad antibacteriana de las levaduras puede originarse a partir de metabolitos como ciertas enzimas, toxinas o micocinas y ácidos orgánicos. Si bien, en el presente trabajo se evidenció que la levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 disminuye la capacidad de asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis *in vitro*, resta aún dilucidar el o los mecanismos a través de los cuales ejerce este efecto antagónico.

CONCLUSIONES

- ✓ Las cepas *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 81111, CIDCA 9121, NCYC 2907 y NCYC 1429 mostraron capacidad para desarrollar en tres medios industriales formulados a partir de desechos de la industria alimentaria como son: melaza de caña de azúcar, suero de quesería y permeado de suero de quesería.

- ✓ Las cuatro cepas seleccionadas produjeron etanol a partir de suero y permeado de suero de quesería con un alto rendimiento en el consumo de lactosa durante cinco ciclos de fermentación consecutivos en un sistema miniaturizado, y en particular, la cepa CIDCA 9121 mostró una mayor estabilidad ciclo a ciclo.

- ✓ *K. marxianus* CIDCA 9121 crecida en permeado de lactosuero sobrevivió a las condiciones del tracto gastrointestinal *in vitro* e *in vivo*; presentó capacidad moduladora de la respuesta inmune innata de epitelio intestinal *in vitro* y actividad antiinflamatoria en un modelo animal de inflamación intestinal aguda, luego de ser sometida a un proceso industrial simulado.

- ✓ El modelo de monocapa de células epiteliales intestinales Caco-2/TC7 permitió poner en evidencia la capacidad de adhesión de las levaduras CIDCA 81111, CIDCA 8154, NCYC 2907 y NCYC 1427, siendo *K. marxianus* CIDCA 9121 la que mostró mayor adherencia al epitelio intestinal al crecer en permeado de lactosuero.

- ✓ La levadura CIDCA 9121 mostró capacidad de autogregación pero no co-agregó con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis al cabo de una hora de incubación.

- ✓ La presencia de *K. marxianus* CIDCA 9121, así como el pretratamiento de *S*. Enteritidis con la levadura o su sobrenadante, redujeron significativamente la invasión del patógeno a células del epitelio intestinal Caco-2/TC7.

2

Optimización y escalado de la producción de biomasa de levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 a partir de permeado de lactosuero

INTRODUCCIÓN

La problemática de la generación de grandes cantidades de lactosuero como un coproducto de la producción quesera en la Argentina sigue siendo un tema que representa una pérdida de valor con especial impacto en pequeños y medianos productores. Casi un 50% del suero producido en nuestro país es generado por pequeñas y medianas empresas donde los litros producidos diariamente rondan entre los 5.000 y 50.000 litros. Este suero es utilizado mayormente para alimentación animal o volcado al ambiente con tratamientos no óptimos. Solo algunos establecimientos lo emplean para otros fines de mejor rendimiento económico y menor impacto ambiental. La principal causa de esta situación es la falta de equipamiento e inversión para el pretratamiento del suero o bien las falencias en dicho proceso, lo cual restringe en gran medida las posibilidades de aplicación de otros procesos tecnológicos de industrialización. En cambio, aquellas empresas que industrializan más de 50.000 litros de leche por día poseen mayores oportunidades de negocio debido a que por lo general cuentan con un respaldo económico suficiente como para acceder a equipos y tecnologías que les permiten aprovechar de manera más eficiente el lactosuero que producen.

Recientemente en nuestro grupo de trabajo hemos realizado un estudio de factibilidad económica con tres modelos de negocios planteados para la implementación de una planta industrial que acopie suero proveniente de PyMEs queseras y a partir del cual se obtengan concentrado proteico WPC35 (Whey Protein Concentrated 35%), etanol a partir de la fermentación del permeado de suero remanente con levadura *Kluyveromyces marxianus* y biomasa de levadura probiótica. El análisis llevado a cabo bajo la herramienta Bussines Model Canvas, concluyó que la producción de concentrados proteicos y en especial el de WPC35 constituye un modelo de negocios consolidado, con una posición de desarrollo favorable respecto al bioetanol. Tanto en Argentina como en el mundo existen competidores bien afianzados que producen etanol empleando modelos productivos ya desarrollados a partir de la industria azucarera, por lo que desde esta perspectiva se presentan barreras que dificultan la inserción de este producto en el mercado bajo las condiciones planteadas en este tipo de biorrefinería. Por otra parte, desde el punto de vista de modelo de negocios la producción de biomasa microbiana de levadura *Kluyveromyces marxianus* no se encuentra desarrollada en el mercado local de aditivos probióticos para consumo humano o animal, por lo que representa un gran desafío y a su vez una gran oportunidad con mucho potencial por explorar. Existen en Europa y Estados Unidos empresas que se dedican a la producción de cepas de *K. marxianus* como probióticos tanto para animales como para humanos, siendo esta una de las primeras levaduras no *Saccharomyces* aceptada por normativa EFSA y FDA para estos fines.

Kluyveromyces marxianus fragilis B0399 fue la primera levadura no *Saccharomyces* aprobada como probiótico para la alimentación animal y el consumo humano. Esta cepa ha sido recomendada como agente biológico añadido a alimentos y piensos en la lista de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA 2013) (Moradi et al.,2018).

Estudios presentados en el capítulo 1 evidenciaron que la cepa *K. marxianus* CIDCA 9121 es capaz de fermentar eficientemente la lactosa presente en el permeado de suero de quesería para obtener etanol. Asimismo, la biomasa remanente de este proceso tiene propiedades probióticas, permitiendo así un proceso integrado para la obtención de proteínas de suero, etanol y levadura probiótica a partir del suero de quesería (Pendón et al. 2021). Teniendo en cuenta los análisis de factibilidad, se decidió avanzar hacia la optimización de la producción de biomasa probiótica y el escalado en volumen como paso previo a cualquier aplicación y transferencia tecnológica de la biorrefinería descripta. El escalado es un paso esencial para pensar en una potencial transferencia tecnológica ya que permite verificar que las propiedades del producto (el efecto inmunomodulador en este caso), así como los parámetros de cultivo sean los mismos en la escala de laboratorio como en condiciones de cultivo no ideal. Existen, en principio, dos pasos en el escalado de un bioproceso. El primero es el cambio de geometría, frasco Erlenmeyer a biorreactor. En este primer salto se verifican cambios del proceso, principalmente a las mejoras en la agitación que trae consigo cambios en el mezclado, la transferencia de O_2 y los esfuerzos de corte. El segundo paso es el aumento de escala, pasando de reactores de volúmenes menores a 10 litros, que poseen comportamiento ideal, a reactores de escala piloto (idealmente de 50 litros o más) que tienen comportamiento no ideal, más semejante a lo que será un reactor de producción. Por razones de equipamiento, en esta tesis sólo se pudo llegar a una escala de 15 litros.

OBJETIVOS

Los estudios previos evidenciaron que *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 es capaz de crecer en permeado de lactosuero al 10% p/v bajo condiciones industriales simuladas de interés para la producción de etanol. Se plantea a continuación como objetivo central de este capítulo el estudio del aumento de escala en la producción de biomasa de la levadura probiótica

Los objetivos específicos son:

- Determinación de los parámetros de crecimiento de *K. marxianus* CIDCA 9121 en permeado de lactosuero.
- Cambio de escala en la producción de biomasa de levadura: optimización de medio de cultivo.
- Estudio de la capacidad inmunomoduladora de la biomasa producida en distintas condiciones.

MATERIALES Y MÈTODOS

2.1 Microorganismos

K. marxianus CIDCA 9121 conservada a -80 °C en YPD con glicerol estéril al 50 % fue reactivada en caldo YPD (ver anexo) e incubada en aerobiosis a 30 °C durante 24 h sin agitación. Además, se mantuvo un cepario activo en agar YGC inclinado a 4°C.

2.2 Determinación de parámetros de crecimiento

Para estudiar la cinética de crecimiento de *K. marxianus* CIDCA 9121 en permeado de lactosuero 100 g/L, se partió de un inóculo de la levadura creciendo en medio YPD 24h a 30ºC, tal como se muestra en la figura 2.1. Se construyó una curva de crecimiento tomando medidas de DO_{610} durante 24h y a partir de esta se calcularon los parámetros la definen: tiempo de latencia, velocidad de crecimiento, tiempo de generación y cosecha máxima a las 24h. Se incubó a 30ºC y con agitación a 150 rpm. La densidad óptica se determinó a una longitud de onda de 610 nm (DO610), sobre alícuotas de los cultivos y empleando un espectrofotómetro Metrolab 330 (Metrolab, Argentina).

2.3 Efecto de la utilización de permeado de lactosuero en reemplazo de YPD para inóculo inicial

Se utilizaron dos Erlenmeyer de 500 ml con 150 ml de permeado de lactosuero 100 g/L estéril. Cada uno de estos, se inoculó con 15 ml de la levadura crecida en medio YPD o medio permeado de lactosuero 100 g/L durante 24h a 30°C. Se construyó una curva de crecimiento tomando medidas de DO_{610} durante 24h y a partir de esta se calcularon los parámetros que la definen tal como se indicó anteriormente.

2.4 Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento

Para realizar este ensayo se emplearon Erlenmeyer de 500 ml con 150 ml de medio formulado a base de permeado de lactosuero 20 g/L, al que se le adicionaron diferentes fuentes de nitrógeno: peptona de carne, extracto de levadura y sulfato de amonio según se muestra en la tabla 2.1. Se incluyó entre las variables un medio de cultivo sin agregados de fuente de nitrógeno.

Tabla 2.1: Composición de medios formulados a base de permeado de lactosuero y diferentes fuentes de nitrógeno.

Formulaciones	Permeado	Sulfato de amonio	Peptona de carne	Extracto de levadura
PS	20 g/L	7 g/L	-	-
PSE	20 g/L	7 g/L	-	10 g/L
PPE	20 g/L	-	20 g/L	10 g/L
P s/aditivos	20 g/L	-	-	-

Cada Erlenmeyer fue sembrado con un inóculo 15 ml de *K. marxianus* CIDCA 9121 crecida en YPD 24h a 30°C, previamente centrifugado a 5000 g durante 5 min y lavado una vez con PBS estéril. Se tomaron medidas de DO_{610} cada una hora durante 8 h y un punto final a las 24h de incubación a 30°C con agitación 150 rpm. Además, a los mismos tiempos se recolectaron muestras para medida de lactosa remanente en el medio por método de Antrona y pH. A las 24 h, se centrifugó la totalidad del volumen, se pesó la biomasa húmeda obtenida y se realizó recuento de levaduras viables por técnica de la gota.

Figura 2.1: Fotografías del ensayo de efecto de fuentes de nitrógeno sobre la producción de *K. marxianus* CIDCA 9121. Medios antes de ser inoculados con la levadura (izquierda) y al finalizar el cultivo (derecha).

2.5 Efecto de la utilización de hidrolizado de levadura en reemplazo de extracto de levadura comercial sobre la producción de biomasa de K. marxianus CIDCA 9121

Para este ensayo se utilizaron Erlenmeyer de 500 ml con 150 ml de medio formulado a base de permeado de lactosuero 20 g/L, a los que se les adicionó 10 g/L extracto de levadura o hidrolizado de levadura de grado alimentario MELAR (levadura de cerveza en polvo) . Como control se utilizó un Erlenmeyer conteniendo permeado de lactosuero sin aditivos. Todos los cultivos se iniciaron con el mismo volumen de inóculo de la levadura obtenido en medio YPD 24 h a 30°C, centrifugado y lavado con PBS estéril. Los cultivos se incubaron en agitación 150 rpm a 30°C durante 24h y se tomaron medidas de DO a 610 nm y pH, al inicio y al final de la incubación. Al cabo de 24h, la totalidad del volumen del cultivo se centrifugó a 5000 g durante

5 min, se pesó la biomasa obtenida y se realizó el recuento de levaduras viables por técnica de la gota.

Los medios utilizados en este ensayo se prepararon pesando los ingredientes, resuspendiendo en agua destilada y esterilizando por calor húmedo a sobrepresión. En el caso del agregado de hidrolizado de levadura de grado alimentario se testearon dos procedimientos distintos para el acondicionamiento correcto. Uno de los tratamiento comenzó con la resuspensión de la cantidad de levadura en polvo en agua destilada seguido de esterilización por vapor fluente durante 20 min y centrifugación para trabajar con el sobrenadante, y otro, donde se partió de la resuspensión de levadura en agua seguido de esterilización en autoclave por calor húmedo a sobrepresión durante 15 min y decantado de residuos sin centrifugación.

2.6 Cultivo a escala de Biorreactor de 5L

Se empleó un biorreactor con capacidad de 5L Inceltech LH 210 (Figura 2.2) y se diseñó un ensayo en dos etapas, una etapa de cultivo *batch* y una etapa *bacth alimentado*.

→ *Inóculo*: se transfirieron colonias de *K. marxianus* CIDCA 9121 crecidas en YGC a un Erlenmeyer de 1L con 300 ml de YPD. Se incubó 24 h a 30°C. Al cabo de 24 h, el inoculo fue transferido al biorreactor. En los ensayos donde se utilizó medio optimizado con sulfato de amonio /hidrolizado de levadura, la totalidad del volumen del inóculo se centrifugó a 6500 rpm durante 5 min y se lavó con PBS estéril; el pellet obtenido se resuspendió en 300 ml de PBS estéril para sembrar el biorreactor.

→ *Cultivo batch*: se utilizaron 2,7 L de medio a base de permeado de lactosuero 20 g/L con adición o de una fuente de nitrógeno como peptona de carne o sulfato de amonio, y factores de crecimiento aportados por extracto de levadura o hidrolizado de levadura comercial en las concentraciones descriptas para cada ensayo. La duración de la etapa batch varió entre 14y 19h.

→ *Cultivo batch alimentado*: se utilizaron 1,5 L de medio a base de permeado de lactosuero 150 g/L con adición o de una fuente de nitrógeno como peptona de carne o sulfato de amonio, y factores de crecimiento aportados por extracto de levadura o hidrolizado de levadura comercial en las concentraciones descriptas para cada ensayo. La duración de la etapa batch varió entre 23 y 25 h. La velocidad de alimentación fue seteada entre 0,075 L/h – 0,1 L/h.

El equipo posee control de temperatura, pH y medida de oxígeno disuelto (electrodo pH Ingold y electrodo de oxígeno Mettler). La temperatura de fermentación fue de 30°C. A diferentes tiempos se tomaron muestran para determinaciones analíticas tales como densidad óptica a 610 nm, peso seco y lactosa remanente en sobrenadante de cultivo.

Al finalizar la alimentación el total del cultivo se cosechó en forma estéril y se centrifugó a 6800g durante 10 min en centrífugas Sorvall Instruments Du Pont modelo RC5-C y RC5-B para obtener la biomasa húmeda a la que le realizó un recuento de levaduras viables por técnica de la gota. La biomasa fue almacenada en heladera a 4°C para demás determinaciones.

Figura 2.2: Biorreactor 5L Inceltech LH 210.

2.7 Cultivos a escala de Biorreactor de 15L

Se trabajó con un biorreactor de capacidad máxima de 15L, con un sistema de monitoreo de 0_2 y pH.

→ *Inóculo:* se transfirieron colonias de *K. marxianus* CIDCA 9121 crecidas en medio YGC a dos Erlenmeyer de 1L con 500 ml de YPD. Se incubó 24 h a 30°C y antes de sembrar en biorreactor se centrifugó la totalidad del volumen a 5000 g durante 5 min y se lavó con PBS estéril una vez. El pellet obtenido se resuspendió en 1L de PBS estéril y de esta forma se sembró en el biorreactor.

→ *Cultivo batch:* se utilizaron 10 L de medio a base de permeado de lactosuero 20 g/L adicionado con 7 g/L de sulfato de amonio y 1 g/L de hidrolizado de levadura. La duración de la etapa batch fue de 12 h.

→ *Cultivo batch alimentado:* se utilizaron 3 L de medio a base de permeado de lactosuero 150 g/L con adición de 7 g/L de sulfato de amonio y 7 g/L de hidrolizado de levadura. La velocidad de alimentación fe seteada entre 0,125 L/h y la duración de esta etapa fue de aproximadamente 24 h.

El equipo posee control de temperatura, pH y medida de oxígeno disuelto (electrodo pH Ingold y electrodo de oxígeno Mettler). La temperatura de fermentación se mantuvo en 30°C. Se utilizó antiespumante siliconado de grado microbiológico. A diferentes tiempos se tomaron muestras para determinaciones analíticas tales como DO a 610 nm y peso seco.

Al finalizar la alimentación, el total del volumen de cultivo se cosechó en forma estéril y se procedió como se indicó anteriormente para el biorreactor de 5L.

Figura 2.3: Biorreactor 15L Bromma, Modelo LKB.

2.8 Determinaciones analíticas

→ *Determinación de Absorbancia a 610 nm*

La densidad óptica se determinó a una longitud de onda de 610 nm sobre alícuotas de los cultivos y empleando un espectrofotómetro Beckman DU 640.

→ *Determinación de lactosa remanente por Método Antrona*

Se utilizó el método de Antrona/sulfúrico (Southgate, 1976) con modificaciones. La mayoría de los carbohidratos dan la reacción de la Antrona/sulfúrico en alguna medida, pero en las condiciones descriptas es específica para hexosas. Todos los polisacáridos reaccionan en medio ácido fuerte dando un cromógeno (furfural y derivados) que condensan con el cromóforo (reactivo) para dar color. A diferentes tiempos de cultivo se tomaron muestras, se centrifugaron a 6500 rpm durante 5 min y el sobrenadante obtenido se separó para la determinación. Se prepararon las diluciones correspondientes con agua bidestilada y en tubos de vidrio con tapa se mezclaron 200 µl de la muestra a analizar con 2 ml de reactivo de Antrona (ver Anexo). A continuación, se homogeneizaron por inversión y se colocaron en un baño de agua a 100 °C durante 15 min. Se enfríaron en un baño de agua a temperatura ambiente y se dejaron en la oscuridad durante 30 minutos. Finalmente, 200 µl de las muestras fueron transferidos a una placa de 96 fosas y se realizó la medida de la absorbancia a 620 nm en un lector de placas (SYNERGY HT–SIAFRT™, Winooski, VT, USA). Para determinar la concentración de azúcares totales se empleó una curva de calibración con soluciones de glucosa (50-500 µg/ml).

→ *Determinación del peso seco*

A diferentes tiempos se tomaron muestras de 10 ml, se centrifugó a 6500 rpm durante 5 min. El pellet obtenido se lavó dos veces y se resuspendió en agua destilada para ser transferido a frascos de vidrio limpios y secos, previamente tarados. Las muestras se llevaron a estufa a 105°C hasta peso constante.

→ *Recuento de levaduras viables por técnica de la gota*

El recuento de levaduras por técnica de la gota se llevó a cabo como se detalló en el capítulo 1. En cada ensayo, a partir de la muestra se realizaron diluciones seriadas 1/10 en solución fisiológica estéril pH 7 y se sembraron 20 µl de cada dilución por duplicado en placas con YGC. Luego de la incubación durante 24h a 30 °C se contaron las colonias y se expresó la concentración de levaduras viables como UFC/g de biomasa húmeda.

2.9 Determinación de capacidad inmunomoduladora a nivel intestinal

El sistema reportero Caco-2 ccl20:luc detallado en el Capítulo 1 se empleó para la determinación de la capacidad inmunomoduladora de la biomasa obtenida en las diferentes condiciones y escalas de trabajo ensayadas. Una suspensión de flagelina de *Salmonella tyhimurium* (FliC) 1 µg/ml se empleó como estímulo proinflamatorio y para las medidas de luminiscencia se utilizó el kit comercial Luciferase Assay System y un luminómetro Labsystems Luminoskan TL Plus (Thermo Scientific, USA).Todos los ensayos incluyeron un control de la actividad basal de las células que no recibieron ningún tratamiento y con este mismo se obtuvo el 100% de actividad luciferasa. Los resultados se expresaron como porcentaje de luminiscencia ± error estándar de la media (NAL ±SEM) de al menos tres experimentos independientes.

2.10 Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0.2 para Windows (GraphPad®, EE.UU.). Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. Para la comparación de medias, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) seguido del Test de Tukey. Se consideraron diferencias significativas aquellas con un valor de $p < 0,05$

RESULTADOS Y DISCUSION

Considerando la madurez tecnológica que tiene el proceso de producción de bioetanol a partir de melaza, el análisis económico realizado sobre los distintos modelos de negocio derivados de la biorrefinería desarrollada en el capítulo 1 mostró que la mayor competitividad de la misma se puede lograr maximizando la producción de biomasa probiótica. En este escenario alternativo a la producción de etanol, se planteó estudiar otra condición de crecimiento de la levadura totalmente diferente, manteniendo máxima la aireación por agitación mecánica y/o burbujeo de aire de manera de maximizar el metabolismo oxidativo. En estas condiciones se maximiza el crecimiento y la generación de biomasa, siendo mínima la producción de bioetanol. En términos económicos, esta alternativa puede ser interesante, siendo que la rentabilidad de la producción de probiótico puede ser mayor que la de generación de bioetanol. Por otra parte, en estas condiciones, el estrés al que son sometidas las levaduras al final del cultivo es mucho menor, siendo todavía mayores las chances de conservación de las propiedades probióticas. Esta segunda modalidad de cultivo fue analizada como alternativa, tanto para disminuir el riesgo de pérdida de propiedades probióticas como para determinar el rendimiento en producción de biomasa a fin de determinar la rentabilidad del proceso cuando se maximiza la cantidad de levadura probiótica obtenida a expensas de la generación de bioetanol.

En la microbiología industrial, la transferencia de un proceso a pequeña escala en el laboratorio a un equipo comercial o gran escala se denomina **escalado**. Los primeros pasos del escalado se realizan en el laboratorio donde se evidencian indicios de que un proceso de interés industrial es factible. Es así que, el procedimiento empleado para la producción de biomasa de levadura CIDCA 9121 a partir de permeado de lactosuero se inició en Erlenmeyer, tal como se muestra en la figura 2.4. En estas condiciones el rendimiento en gramos de biomasa a partir de los litros de medio empleados para su crecimiento fue de 20 g/L. Esta metodología nos permitió obtener biomasa de levadura viable para la caracterización probiótica detallada en el Capítulo 1 y, además, validar la operatividad de un proceso de obtención de biomasa de levadura probiótica a partir de permeado de lactosuero.

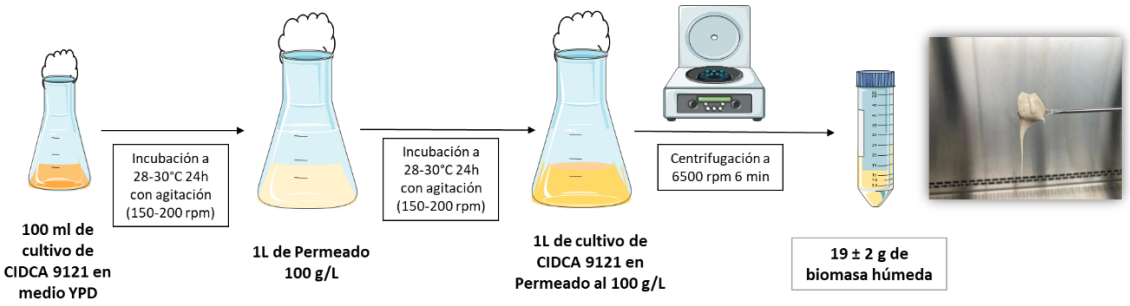


Figura 2.4: Esquema de producción de biomasa de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 a escala laboratorio

Para iniciar proceso de escalado es de vital importancia conocer los parámetros de crecimiento del microorganismo al que se le quiere asignar una aplicación industrial. Es por esto que se determinaron los parámetros de crecimiento de *K. marxianus* CIDCA 9121 en permeado de lactosuero partiendo de un inóculo de la levadura crecida en YPD 24h a 30ºC. A partir de la gráfica de la curva de crecimiento de Ln DO vs tiempo se identificaron las fases de crecimiento correspondientes a la latencia, exponencial y estacionaria. El tiempo de latencia fue de 90 min, la cosecha máxima alcanzada fue de DO: 6,53 a las 24h, y la velocidad de crecimiento tuvo un valor de 0,48 h^{-1} (Figura 2.5). Este último valor concuerda con lo observado por otros autores como Bellaver et al. (2004) que obtuvieron una velocidad máxima de 0,44 h^{-1} cuando la levadura *K. marxianus* CBS 6556 fue crecida en cultivo batch con lactosa como única fuente de carbono. En otros trabajos, como el de Fonseca et al. (2007), la velocidad máxima obtenida fue de 0,49 h^{-1} para una cepa de *K. marxianus* creciendo en cultivo batch, pero en un medio mineral liquido con glucosa como única fuente de carbono. Por su parte, Lane et al. (2011) evaluaron el crecimiento de varias cepas de *K. marxianus* en un medio con extracto de levadura, peptona y lactosa, y los valores de velocidad máxima obtenidos estuvieron en un rango un de 0,50 h^{-1} y 0,99 h^{-1} para para diferentes cepas de *K. marxianus.*

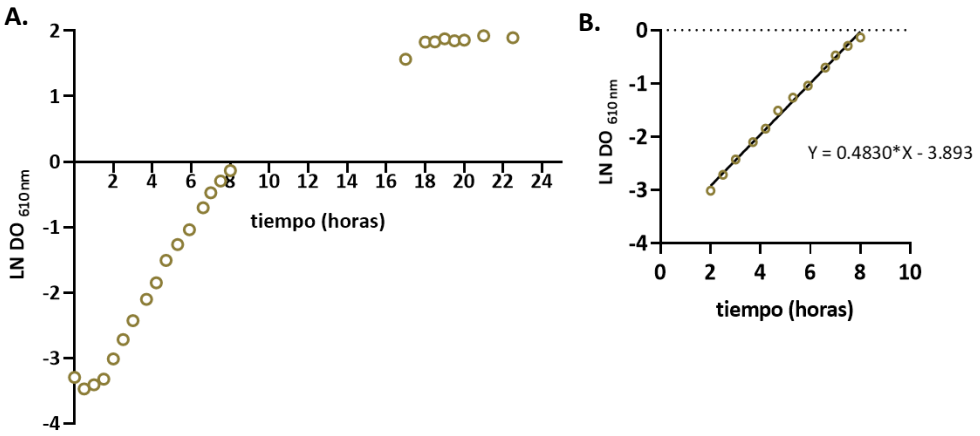


Figura 2.5: Curva de crecimiento de *K.marxianus* CIDCA 9121 A. Cinética de crecimiento en permeado de lactosuero 100 g/L a 30°C durante 24h **B.** Regresión lineal para puntos en fase exponencial de crecimiento. Se detalla la ecuación de la recta de la cual se desprenden algunos parámetros.

Tal como se detalló anteriormente (Figura 2.4), el proceso de obtención de biomasa comienza con la producción de un inóculo inicial de la levadura en YPD. Este medio es ampliamente utilizado para el cultivo de levaduras en el laboratorio; tiene como fuente de carbono principal una dextrosa, en nuestro caso D-glucosa 20 g/L, peptona de carne 20 g/L que además de aportar fuente de carbono alternativa y fuente de nitrógeno, también presenta capacidad buffer y extracto de levadura 1(0 g/L), que aporta factores de crecimiento especialmente vitaminas del grupo B. El hecho de que el inóculo utilizado represente un 10% del volumen del cultivo final cuando trabajamos con volúmenes pequeños de 1L a escala laboratorio no es relevante, pero los recipientes de fermentación que se emplean a mayor escala tienen una capacidad que oscila entre los 40.000 y los 200.000 litros y ese volumen de inóculo adquiere valores de 4.000-20.000 litros respectivamente, con lo cual comienza a tomar relevancia en los costos finales del proceso. Por esta razón, se evaluó el efecto de reemplazar el medio YPD por permeado de lactosuero en el desarrollo del inóculo inicial.

Tabla 2.2: Efecto del medio de cultivo utilizado para el inóculo.

Cepa	Inóculo	T lat (h)	$\mu_{max}(h^{-1})$	g (h)	A (DO610nm)
K. marxianus CIDCA 9121	YPD	1,50	0,48	1,44	6,53
	Permeado 100 g/L	1,50	0,34	2,13	2,15

En la tabla 2.2 se puede observar que los parámetros de crecimiento de la levadura CIDCA 9121 son afectados por el medio utilizado para obtener el inóculo inicial. En particular, la velocidad de crecimiento mostró una disminución del 29% y la cosecha máxima de un 66%. Esto tiene sentido si tenemos en cuenta que con el agregado del inóculo estamos aportando el excedente de nutrientes del medio en el que se formuló, es decir, un inóculo que fue desarrollado en medio YPD podría estar aportando al momento de siembra excedentes de peptona de carne, extracto de levadura al medio fresco a base de permeado de lactosuero.

Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de biomasa de *K. marxianus* CIDCA 9121

El diseño de un medio de cultivo debe tener en cuenta lo requerimientos nutricionales del microorganismo. Una primera aproximación con respecto a las cantidades a utilizar de las diferentes fuentes de nutrientes lo da el conocimiento de la composición de biomasa del microorganismo a ser empleado. No obstante, cuando el medio de cultivo está constituido por fuentes nutricionales no convencionales resulta imperativa su optimización, la cual debe

además considerar la disponibilidad real de los nutrientes, estabilidad química y costo (Értola *et al.,* 2006).

El sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$ es una sal inorgánica con varios usos comerciales que contiene 21% de nitrógeno y 24% de azufre. Debido a su naturaleza iónica, el sulfato de amonio es muy soluble en agua lo que le da versatilidad en su uso en diferentes aplicaciones agrícolas e industriales. Se utiliza principalmente como fertilizante para suelos alcalinos, en biología molecular para precipitar proteínas solubles y también como aditivo alimentario, generalmente reconocido como seguro (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. Todas estas características lo hacen un ingrediente atractivo para su utilización como fuente de nitrógeno para medios de cultivos a gran escala ya que su costo es muy inferior al de las peptonas y/o extractos de levadura.

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y producción de biomasa de levadura CIDCA 9121 fueron a base de permeado de lactosuero que aporta principalmente lactosa como fuente de carbono al que se le adicionó peptona de carne como fuente de nitrógeno. Este último ingrediente resulta costoso a la hora de ser implementado escala industrial, y por esto se estudió el efecto del uso de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno alternativa. Para ello se analizaron a escala laboratorio los parámetros de crecimiento de la levadura, rendimiento de producción de biomasa y recuento de levaduras viables al final del cultivo en permeado de lactosuero (P), permeado y sulfato de amonio (PS), permeado, sulfato de amonio y extracto de levadura (PSE) y permeado, peptona de carne y extracto de levadura (PPE) tal como se muestra en la tabla 2.3. Además, para evitar la incorporación de nutrientes a partir del inóculo en caldo YPD, el cultivo inicial se centrifugó y lavó con PBS.

Tabla 2.3: Parámetros de crecimiento de *K. marxianus* CIDCA 9121, rendimiento de producción de biomasa y recuento de levaduras viables al final del cultivo en los diferentes medios. Se muestran los valores promedios de dos ensayos independientes.

	Tiempo de latencia (h)	μ (h-1)	g (h)	Cosecha máxima (DO610nm)	Rendimiento producción de biomasa (g/L)	Levaduras viables (UFC/g)
P	1,26	0,37	1,86	3,91	7,27	$4,53 \times 10^9$
PS	1,47	0,43	1,63	4,90	12,91	$2,18 \times 10^{10}$
PSE	1,19	0,48	1,44	5,55	14,48	$1,10 \times 10^{10}$
PPE	1,14	0,50	1,38	6,61	17,38	$1,59 \times 10^{10}$

*P: permeado de lactosuero; PS: permeado y sulfato de amonio; PSE: permeado, sulfato de amonio y extracto de levadura y PPE: permeado, peptona de carne y extracto de levadura.

Los resultados obtenidos demostraron que la levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 es capaz de crecer en las cuatro formulaciones propuestas. Sin embargo, el crecimiento de la levadura en un

medio formulado solo con permeado de quesería mostró una menor velocidad de crecimiento, así como una disminución de casi un 50% en la cosecha máxima al cabo de 23 h de cultivo a 30°C, acompañado también de una disminución significativa en la producción de biomasa al final del cultivo traducida en un rendimiento de 7,27 g de biomasa/litro de cultivo (Tabla 2.3). La falta de una fuente de nitrógeno y factores de crecimiento causan una disminución significativa en los parámetros de crecimiento y producción de biomasa tal como se observó en el ensayo de utilización de permeado para el inóculo inicial (Tabla 2.2). En este sentido, la adición de una fuente de nitrógeno como sulfato de amonio o peptona de carne al medio base de permeado mejoró significativamente el rendimiento de biomasa y la velocidad de crecimiento de la levadura, alcanzando una velocidad de crecimiento de 0,43 h^{-1} para una formulación PS (permeado al 20 g/L y sulfato de amonio 7 g/L) y un valor de 0,48 cuando además se le adiciona extracto de levadura al 10 g/L (PSE).

Es pertinente resaltar, que el medio formulado con adición de peptona de carne y extracto de levadura (PPE) representa las condiciones de crecimiento que se estaban utilizando hasta el momento para el desarrollo de la levadura, es así que los valores de velocidad de crecimiento de 0,5 h-1 , cosecha máxima de DO 6,61 y rendimiento de biomasa de 17,4 g/L coinciden con los obtenidos en los ensayos anteriores. Por el contrario, el medio formulado con permeado de lactosuero (p) sin aditivos representa la situación más drástica de crecimiento, y los valores obtenidos fueron coincidentes con los observados para el crecimiento de la levadura en el ensayo de formulación de inóculo a partir de permeado de lactosuero.

En la Figura 2.9, podemos observar que para los medios PS y PSE el descenso de pH alcanzó valores de 3 y 3,37, respectivamente; mientras que cuando no se agregó sulfato de amonio el pH se mantuvo en valores de 4,5, esto puede explicarse porque disolución de sulfato de amonio en un el medio acuoso aporta iones amonio catiónico y sulfato aniónico: $2NH_3 + H_2SO_4 \Rightarrow (NH_4)_2SO_4$, lo que se traduce en una disminución del pH a medida que el microorganismo utiliza al NH_3 como fuente de nitrógeno. Si bien esta situación puede corregirse con el agregado de una base, es conveniente tener conocimiento del comportamiento del microorganismo frente a los niveles de pH que se pueden alcanzar y podemos observar que aun cuando se alcanzaron valores de pH mínimos de 3, la viabilidad de la levadura no se vio afectada significativamente (Tabla 2.3).

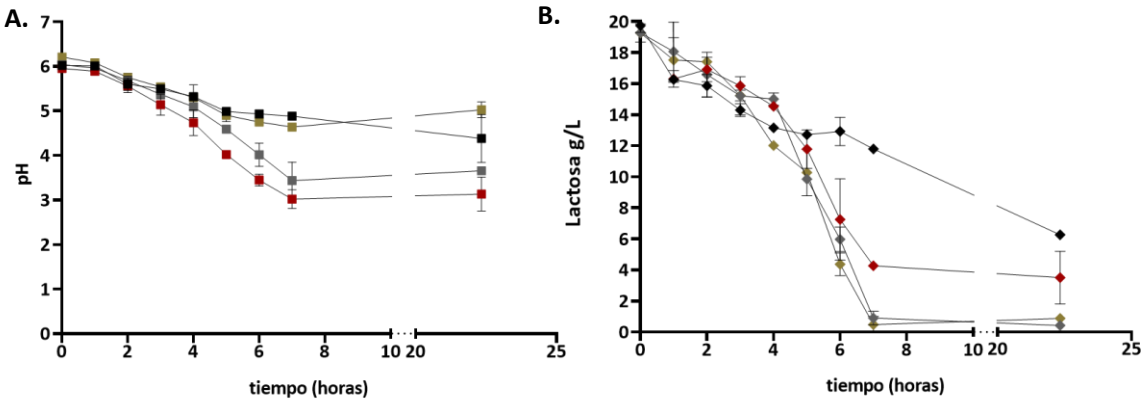


Figura 2.6: A. Evolución de pH en el tiempo **B**. Medida de lactosa remanente en el tiempo para *K.marxianus* CIDCA 9121 creciendo en medio P (●), PS (●), PSE (●) y PPE (●).

La lactosa es el principal hidrato de carbono presente en los medios formulados, aportado exclusivamente por el permeado de suero. La concentración inicial de lactosa fue de 20±0,4 g/L y en todos los medios la levadura CIDCA 9121 logró un consumo de entre el 80-97%, excepto para el medio formulado solo con permeado de lactosuero donde el consumo fue del 67% al cabo de 23h de cultivo (Figura 2.6, B). Esta última observación puede explicarse debido a que, al agotarse la fuente de nitrógeno del permeado, el crecimiento de la levadura se detiene y con ello deja de consumirse la fuente de carbono y energía.

Cabe mencionarse que bien el rendimiento de biomasa se vio afectado por el cambio de formulación de los medios ensayados, la concentración de microorganismos viables alcanzada fue similar en los cuatro casos. De esta manera, pudimos concluir que es posible utilizar un medio de cultivo a base de permeado de lactosuero y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno para la producción de biomasa de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121.

Efecto de utilización de hidrolizado de levadura sobre la producción de biomasa de *K. marxianus* CIDCA 9121

Se conoce que las levaduras requieren de la adición de vitaminas del grupo B como la biotina, tiamina, ácido pantoténico, entre otras, al medio de cultivo para su correcto crecimiento (Értola et al., 2006). Esto quedó demostrado en los resultados mostrados en la Tabla 2.3, donde podemos observar que tanto la cosecha máxima como el rendimiento de biomasa aumentó conforme se adicionó extracto de levadura a los medios de cultivo. El extracto de levadura es un autolisado de células de levadura que se utiliza en la preparación de medios de cultivo microbiológicos como fuente de nitrógeno y factores de crecimiento en un entorno de

laboratorio; la autólisis se controla cuidadosamente para preservar las vitaminas del complejo B de origen natural. Al igual que las peptonas la utilización de extracto de levadura es una práctica que implica un costo elevado pensando en una aplicación en grandes volúmenes de cultivo; por este motivo, se estudió el efecto de la adición de levadura hidrolizada de grado alimentario sobre el crecimiento y producción de biomasa de *K. marxianus* CIDCA 9121.

Los resultados obtenidos mostraron que es posible reemplazar el extracto de levadura comercial por levadura seca de grado alimentario sin modificar drásticamente el parámetro productivo de obtención de biomasa de levadura CIDCA 9121 y su viabilidad al final del proceso (Tabla 2.4).

Tabla 2.4: Producción de levadura CIDCA 9121 en biorreactor de 5L en medios de cultivo de diferente composición

Medio base	Aditivo	pH final	Producción de biomasa (g/L)	Levaduras viables (UFC/g)
Permeado 20 g/L Sulfato de amonio 7 g/L	-	2,63	13,9	$1,02x10^{10}$
	Extracto de levadura comercial 10 g/L	2,8	15	$1,07x10^{10}$
	Hidrolizado de levadura 10 g/L	2,68	16	$6,75x10^{9}$

Una de las principales desventajas que presentó la utilización de hidrolizado de levadura en polvo con respecto al extracto comercial es que tiene baja solubilidad en medio acuoso y además requiere de un tratamiento térmico de esterilización, seguido de una etapa de separación de impurezas por decantación o centrifugación, lo cual resulta en un procedimiento complejo para llevar a cabo a nivel industrial. De todas maneras, se probaron dos tratamientos distintos para la incorporación del hidrolizado al medio del cultivo, uno partiendo de resuspensión en agua destilada, luego esterilización por vapor fluente durante 20 min y centrifugación para trabajar con el sobrenadante, y otro, donde se partió de la resuspensión de levadura en agua seguido de esterilización en autoclave por vapor húmedo a sobrepresión durante 15 min y decantado de residuos sin centrifugación. Los dos tratamientos resultaron efectivos en el acondicionamiento del hidrolizado de levaduras y no modificaron el crecimiento de la levadura. Si bien estos pasos de separación de restos de levadura del hidrolizado son esenciales en este estudio ya que se debe asegurar que el efecto probiótico se deba a la cepa en estudio, al momento de producirlo industrialmente para alimentación animal, este paso de separación de sólido podría evitarse, aceptando que algo de restos de levadura podría ir en el producto final.

Producción de biomasa de levadura en biorreactor de 5L

El recipiente en el que se lleva a cabo un proceso de microbiología industrial se denomina bioreactor. El tamaño de los bioreactores varía desde los pequeños recipientes a escala de laboratorio, con capacidades de 5 a 10 litros, hasta recipientes a escala industrial con capacidad de 500.000 litros. En la práctica, los bioreactores industriales se pueden dividir principalmente en dos tipos: los que se emplean en procesos anaeróbicos y los que se utilizan en procesos aeróbicos. La producción de biomasa de levadura es un proceso que requiere disponibilidad de oxígeno y por lo tanto se utilizaron fermentadores de tanque agitado.

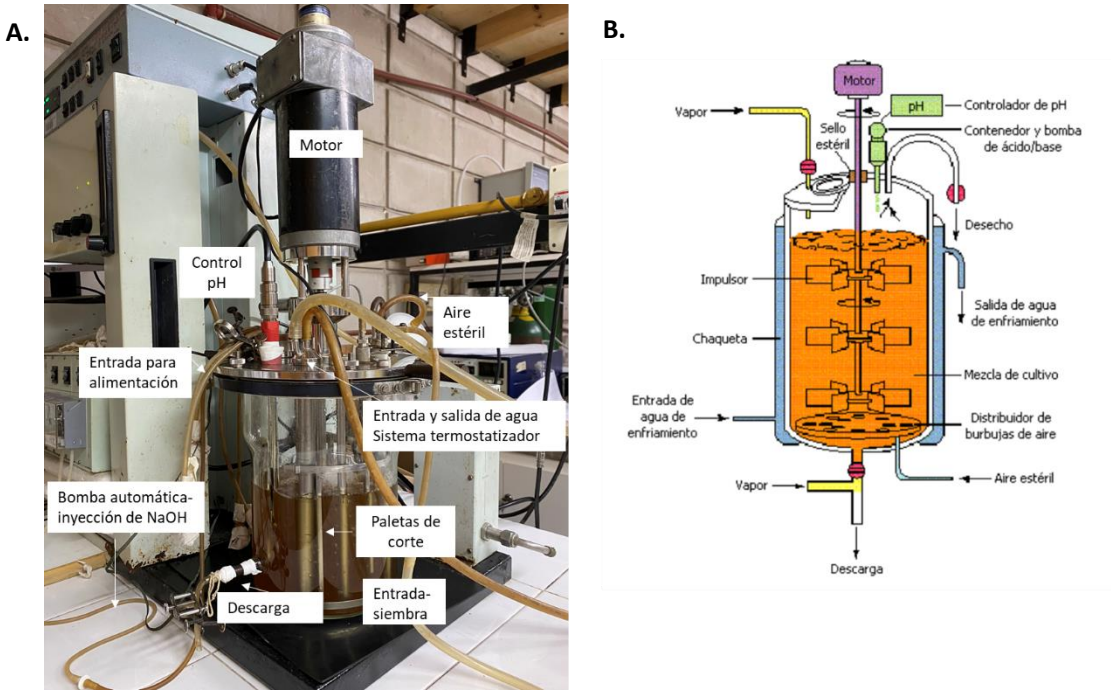


Figura 2.7: Biorreactor de tanque agitado. A. Fermentador de 5L utilizado en los ensayos. **B**. Esquema de la estructura de un fermentador y los dispositivos de aireación y control del proceso (Madigan et al., 2003).

El biorreactor de 5L utilizado en el ensayo se muestra en la Figura 2.7. El mismo consta de un recipiente cilíndrico de vidrio con base plana. En la parte superior una tapa de acero con cierre hermético y sistema de entradas y salidas para inserción de controladores de pH, oxígeno, entrada de medio de alimentación, inóculo, entre otros. El mantenimiento de la temperatura en forma constante y homogénea se realizó por medio de un sistema donde circula agua proveniente de un baño termostatizado a diferencia del fermentador mostrado en el esquema donde circula el agua por una camisa o chaqueta.

Entre las funciones que debe cumplir un biorreactor podemos mencionar mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación, mantener constante y homogénea la temperatura, minimizar los gradientes de concentración de nutrientes y suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo. Para ello, el biorreactor consta de un dispositivo de aireación llamado difusor por donde el aire, esterilizado por filtración, ingresa al dispositivo y un dispositivo de agitación mediado por paletas que mezclan el medio y rompen las burbujas de aire y deflectores cuya función es romper el movimiento circular que genera las turbinas y generar mayor turbulencia y mejor mezclado.

Para evaluar la bondad del proceso de producción de biomasa de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 descripto en la Figura 2.4 en un fermentador de 5L, se diseñó un proceso en tres etapas: obtención del inóculo inicial en Erlenmeyer con agitación y etapas de cultivo en batch y batch alimentado en el biorreactor. Esta manera de trabajar en múltiples etapas es muy común en la producción de levadura para panificación (Lukondeh et al.,2005; Gómez-Pastor et al., 2011). El medio utilizado para el inóculo fue YPD, para el cultivo batch se formuló con permeado de lactosuero (20 g/L de lactosa) y el medio de alimentación utilizado contenía permeado de lactosuero 150 g/L y peptona de carne 20 g/L. La alimentación se inició cuando la concentración de lactosa presente fue cercana a cero. El rendimiento de producción de biomasa suele estar muy regulado por la tasa de alimentación y el control del oxígeno disuelto imprescindible para garantizar el consumo del azúcar a través de la respiración y minimizar el proceso fermentativo. Los elevados niveles de azúcares disparan respuestas celulares como el efecto Crabtree en las levaduras del género *Saccharomyces* sp; si bien las levaduras *Kluyveromyces* en su mayoría no presentan este efecto, la acumulación de sustrato puede desencadenar otro tipo de respuestas metabólicas mediadas por la denominada vía de ras/AMPc/PKA que favorece el metabolismo fermentativo al respiratorio con producción de etanol (Pérez-Torrado et al., 2015). En este caso, la velocidad de alimentación estuvo seteada entre 0,075 L/h y 0,1 L/h. En lo que respecta a las condiciones de agitación, se comenzó con 360 rpm y a partir de comienzo de la alimentación se subió a 700 rpm.

Tal como se observa en la Figura 2.8, el pH se mantuvo en valores de 4,6 ± 0,5 sin necesidad de adición de ningún alcalinizante. Al cabo de 43 h de cultivo se alcanzó una $DO_{610\,nm}$ de 50,6 y 23 g/L de levadura expresada en peso seco. Cabe destacar que en un cultivo batch alimentado se estima que el valor final de biomasa en peso seco debe estar entre 10 y 30 g/L, tal como se obtuvo en este ensayo.

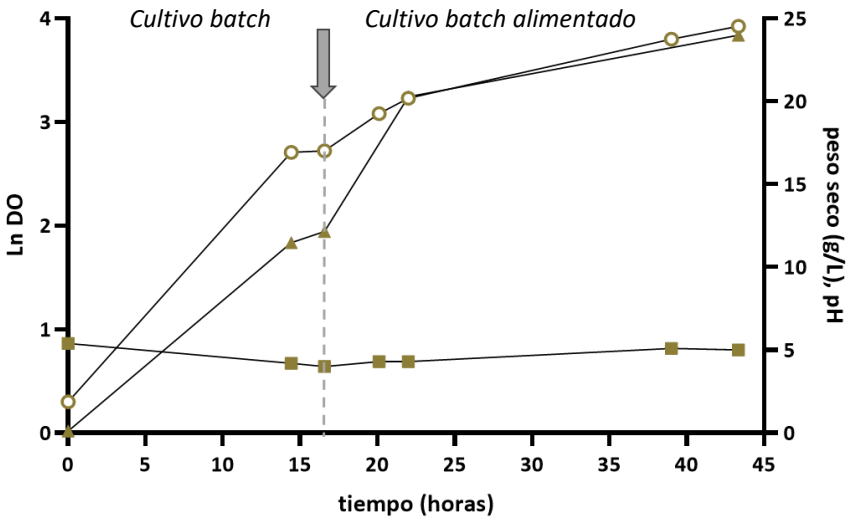


Figura 2.8: Producción de biomasa de *K. marxianus* CIDCA 9121 en biorreactor 5L: Ln $DO_{610\ nm}$ (círculo), pH (cuadrado) y peso seco de levadura (triángulo) en función del tiempo. La flecha gris indica el comienzo de alimentación.

Para la cosecha de biomasa se centrifugó la totalidad del cultivo y se obtuvieron 242 g de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 con una concentración de $4x10^9$ UFC/g.

Figura 2.9: Cosecha de *K.marxianus* CIDCA 9121 al finalizar la fermentación en biorreactor de 5L (izq.) y apariencia de biomasa húmeda obtenida.

De esta forma se determinó que la producción de levadura en las condiciones empleadas en el biorreactor aumentó 3 veces el rendimiento de biomasa húmeda con respecto a lo obtenido en cultivo batch a escala laboratorio, pasando de un valor de 20 g/L a 60,5 g/L.

Con los datos obtenidos, se evaluó la producción de biomasa de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 en biorreactor de 5L empleando los medios de cultivo que se describen en la Tabla 2.5. Para las tres condiciones ensayadas se partió de inóculos de levaduras obtenidos en Erlenmeyer agitado con medio YPD centrifugado y lavado, seguidos de un cultivo batch y un cultivo batch alimentado.

Tabla 2.5: Composición de medios de cultivo utilizados en la producción de biomasa de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 en biorreactor de 5L.

Bioreactores de 5L	Medio *bacth*	Medio *batch alimentado*
PPE	Permeado 20 g/L- peptona de carne 20 g/L - extracto de levadura 10 g/L	Permeado 150 g/L- peptona de carne 20 g/L
PS	Permeado 20 g/L- sulfato de amonio 7 g/L	Permeado 150 g/L- sulfato de amonio 7 g/L
PSH	Permeado 20 g/L- sulfato de amonio 7 g/L- hidrolizado de levadura 10 g/L	Permeado 150 g/L- sulfato de amonio 7 g/L- hidrolizado de levadura 7 g/L

En la figura 2.10 se muestran las cinéticas obtenidas para la levadura creciendo en el medio PS. En estas condiciones, la cepa CIDCA 9121 creció satisfactoriamente, consumiendo hasta un 98% la lactosa presente en el medio. El pH se mantuvo cercano a 5 con agregado de solución NaOH 1M.

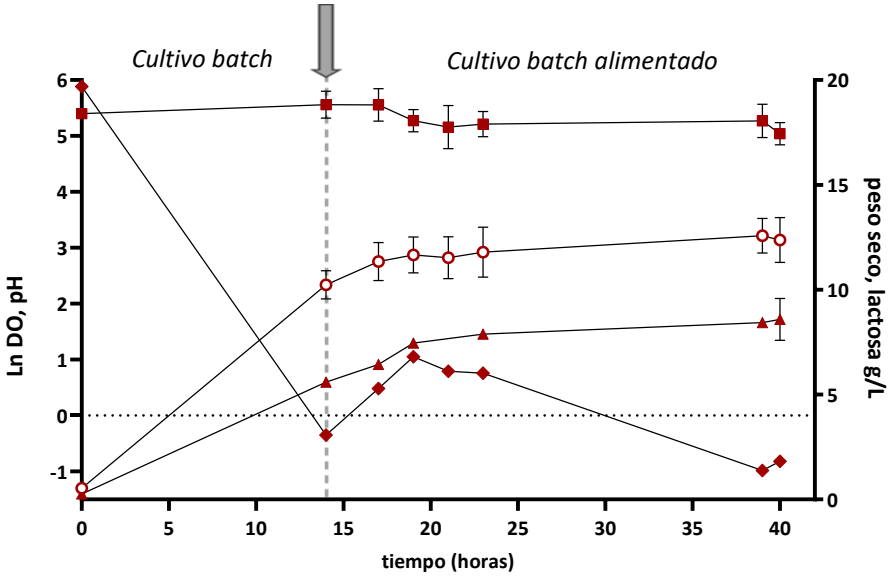


Figura 2.10: Evolución de la Ln $DO_{610\,nm}$ en función del tiempo (circulo blanco), el pH (cuadrado), lactosa remanente en g/L (rombo) y peso seco en g/L (triángulo) en el biorreactor durante la producción de biomasa de *K. marxianus* CIDCA 9121 en medio de cultivo con permeado y sulfato de amonio.

Los rendimientos de producción de biomasa húmeda de levadura CIDCA 9121 obtenidos en las distintas formulaciones fueron significativamente diferentes (Figura 2.11 A). Sin embargo, se observó que la viabilidad de la levadura en la biomasa, por el contrario, no se vio afectada

negativamente al reemplazar de peptona de carne y extracto de carne por sulfato de amonio e hidrolizado de levaduras en los medios de fermentación (Figura 2.11 B).

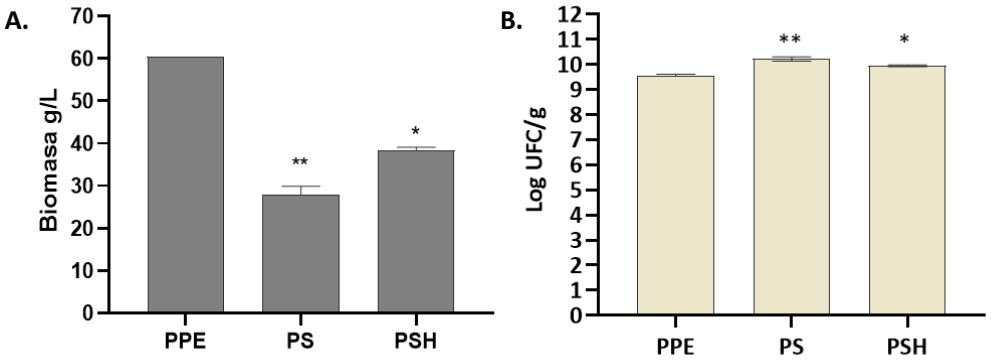


Figura 2.11: A. Rendimiento de producción biomasa de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 en g/L en biorreactor de 5L con medios formulados a base de permeado de lactosuero con adición sulfato de amonio (PS), sulfato de amonio e hidrolizado de levadura (PSH) o peptona de carne y extracto de levadura (PPE). **B**. Recuento de levaduras viables en placas de YGC en la biomasa obtenida al final del cultivo de cada biorreactor. Diferencias significativas *p<0,03, **p<0,002 con respecto a PPE.

En el capítulo 1, hemos demostrado que la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 es capaz de modular la respuesta inflamatoria inducida por la flagelina de *Salmonella* en células del epitelio intestinal utilizando células Caco-2 ccl20: luc. En diversos trabajos se ha descripto que cambios en las fuentes de nitrógeno, carbono y suplementación con diferentes aminoácidos pueden conducir importante cambios en las propiedades biológicas de los microorganismos como la resistencia al estrés térmico y oxidativo mediante la regulación transcripcional de genes (Zhang et al., 2022 a,b). Es así, que todas estas modificaciones en las condiciones de crecimiento pueden influir de manera significativa en las propiedades probióticas de la levadura y es por este motivo que resulta importante confirmar que la biomasa de levadura obtenida en cada biorreactor aún conserva sus propiedades funcionales. Es así, que se evaluó la capacidad inmunomoduladora de la biomasa producida en el biorreactor de 5L bajo diferentes formulaciones de medio y se evidenció que todas las biomasas obtenidas lograron un descenso significativo de la respuesta inflamatoria intestinal con una disminución de la actividad luciferasa del 87-57% (Figura 2.12).

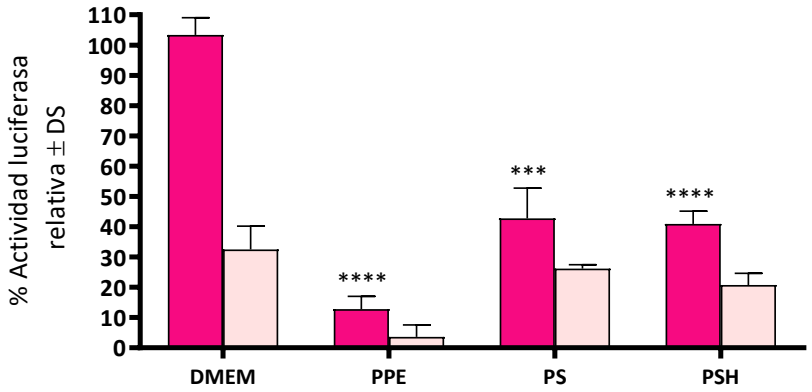


Figura 2.12: Porcentaje de activación de la expresión de luciferasa en células Caco-2 CCL20: luc estimuladas con flagelina previamente tratadas con suspensión de biomasa de levadura CIDCA 9121 obtenida por centrifugación al final del cultivo en biorreactores con medio PPE, PS y PSH. Las barras (●) indican la condición basal y las barras (●) indican condición estimulada con FliC 1µg/ml Diferencias significativas ***p<0,0002, ****p<0,0001 respecto al control

Las propiedades originales utilizadas en la selección de cepas probióticas específicas pueden estar influenciadas por los procesos y condiciones de producción industrial. Garantizar que las propiedades originales de la cepa se mantengan al final del proceso de fabricación de un probiótico es de vital importancia (Grześkowiak et al., 2011).

Estos resultados tomados en conjunto nos permiten concluir que es posible plantear un proceso de producción de biomasa de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 con capacidad probiótica en un medio a base de permeado de lactosuero suplementado con hidrolizado de levaduras y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

Producción de biomasa de levadura en biorreactor de 15 L

Con la finalidad de probar la robustez de este proceso, se realizó un escalado a un biorreactor de 15L como el que se muestra en la Figura 2.2. Para ello se utilizó un proceso llevado a cabo en etapa bacth y batch alimentado tal como se hizo en biorreactor de 5L, utilizando los medios optimizados conteniendo20 g/L permeado, 7g/L sulfato de amonio y 1g/L hidrolizado de levadura y a continuación un cultivo batch alimentado en medio 150 g/L permeado, 7g/L sulfato de amonio y 7g/L hidrolizado de levadura. El proceso se llevó a cabo durante 40 h a 30°C, caudal de oxígeno de 5 L/h y 500 rpm. El pH se mantuvo en 5 ± 0,4 con adición de NaOH 1M.

El rendimiento en la producción de biomasa fue de 45,8 ± 2,8 g/L con una concentración de microorganismos viables de 2,20 ± 1,46 x10^{10} UFC/g. A las levaduras obtenidas de esta manera, se les determinó su actividad inmunomodulatoria en el sistema reportero Caco-2 ccl20: luc observándose una disminución de la actividad luciferasa del 79±5%,

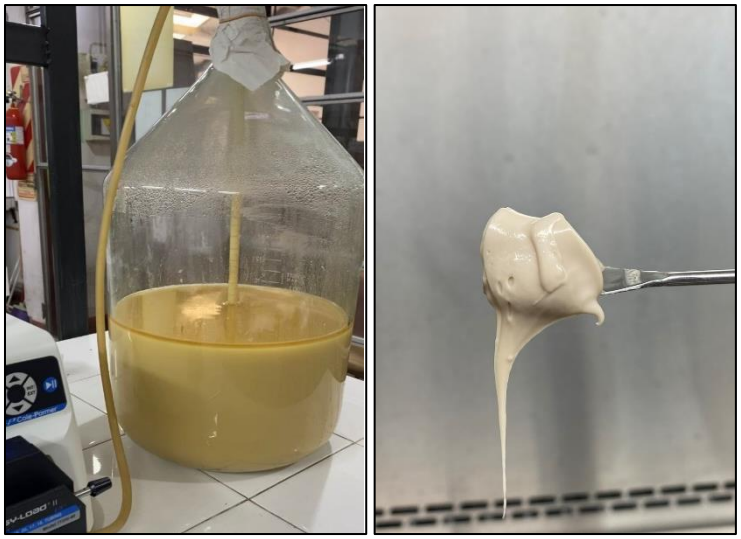


Figura 2.13: Cosecha de Biorreactor de 15L y apariencia de biomasa de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 luego de centrifugación del cultivo cosechado.

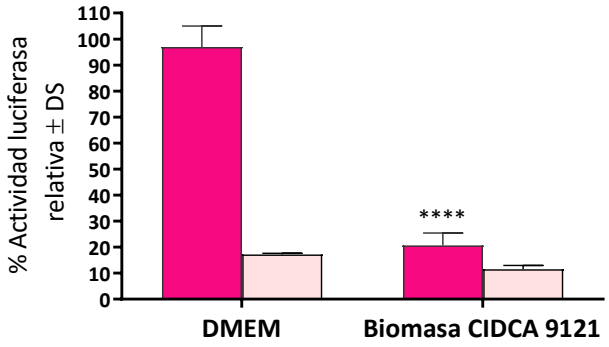


Figura 2.14: Porcentaje de activación de la expresión de luciferasa en células Caco-2 CCL20: luc estimuladas con flagelina previamente tratadas con suspensión de biomasa de levadura CIDCA 9121 obtenida en biorreactor de 15L. Células preincubadas con medio DMEM fueron utilizadas como control. Las barras (○) indican la condición basal y las barras (●) indican condición estimulada con FliC 1µg/ml. Diferencias significativas ****p<0,0001 respecto al control.

Los resultados obtenidos a lo largo de los ensayos expuestos en este capítulo validan la idea de obtener biomasa de levadura probiótica *K. marxianus* CIDCA 9121 a partir la utilización de permeado de suero de quesería como sustrato principal en la fermentación y la suplementación con fuentes de nitrógeno de costo reducido para su aplicación a escala industrial. Los parámetros de producción obtenidos son prometedores para la continuación en el escalado a

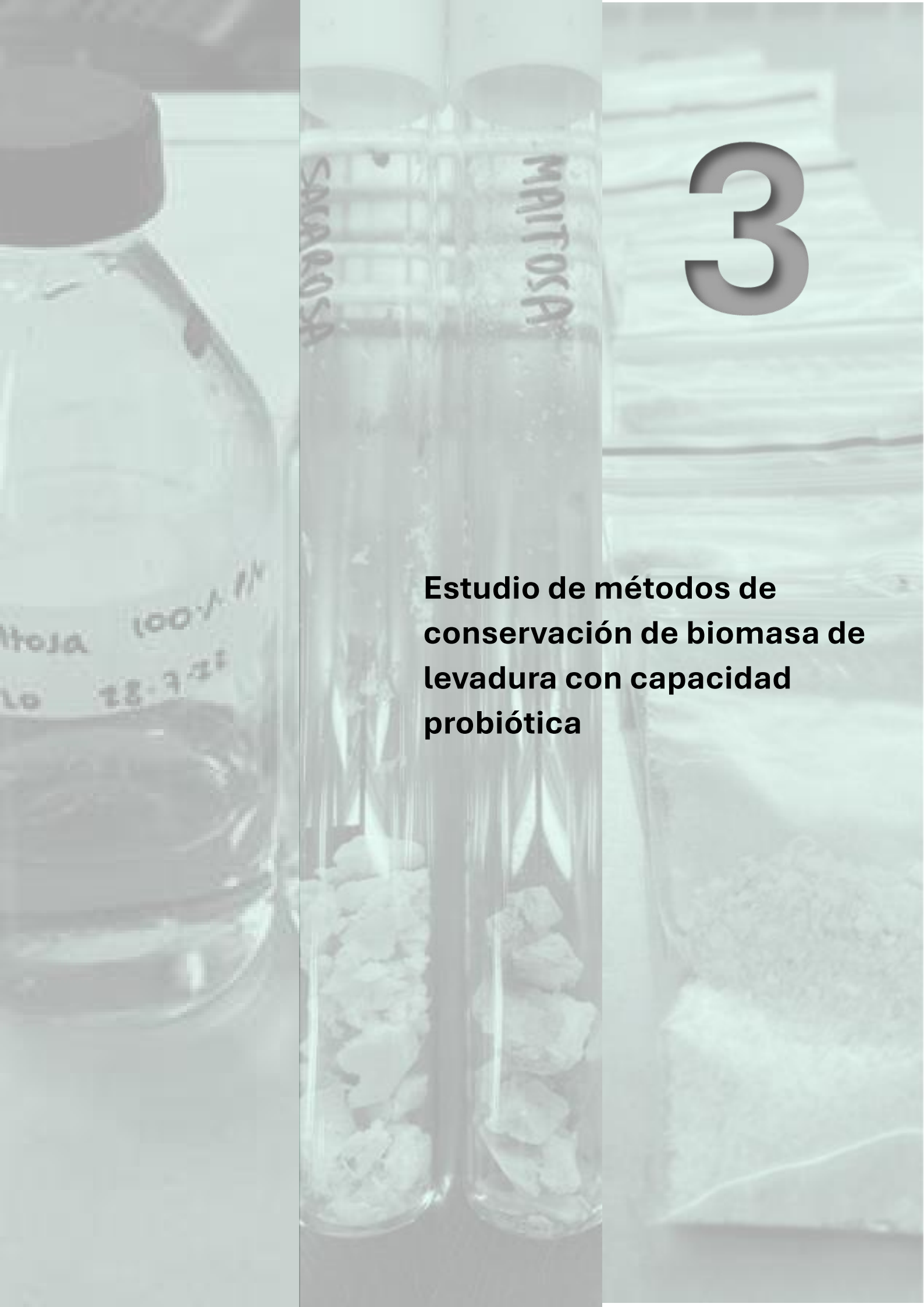
mayores volúmenes y la optimización de otras variables de este proceso, para atender a las altas demandas de producción de suero de quesería que necesitan ser revalorizado. Cabe destacar, que a lo largo de este recorrido se realizaron múltiples producciones de biomasa en biorreactor de 5L y 15L y en algunos casos la levadura enfrentó diferentes situaciones de estrés como limitaciones en O_2 y periodos prolongados a pH 3, y a pesar de esto, la biomasa cosechada al final de cada cultivo presentó actividad inmunomoduladora *in vitro*. Esto refleja la robustez del sistema, y representa una ventaja para futuras transferencias.

CONCLUSIONES

- ✓ El reemplazo de peptona de carne y extracto de levadura en la formulación del medio de cultivo por sulfato de amonio e hidrolizado de levadura comercial provocó una disminución en el rendimiento de biomasa de la levadura CIDCA 9121, pero no afectó la viabilidad de la misma ni su capacidad probiótica.

- ✓ Se validó la producción de biomasa de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 en un biorreactor de 5L con agitación y aireación a 30°C mediante un proceso llevado a cabo en dos etapas: un cultivo batch y un cultivo batch alimentado en un medio industrial a base de permeado de lactosuero.

- ✓ Se evaluó la robustez del proceso de obtención de biomasa de levadura probiótica en biorreactor de 15L, confirmando que es posible la producción de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 a mayor escala con actividad moduladora de la respuesta inmune innata de epitelio intestinal al final del proceso.



3

Estudio de métodos de conservación de biomasa de levadura con capacidad probiótica

INTRODUCCIÓN

Un cultivo de aplicación industrial debe contener el máximo número de células viables, estar libre de contaminantes y ser activo en las condiciones de procesamiento. Por esta razón, es de suma importancia la selección de una metodología de conservación que permita mantener las características por las cuales el microorganismo fue seleccionado (Stambury et al., 1995). De este modo, para la obtención de concentrados de levaduras probióticas es necesario, además de las cepas apropiadas, contar con tecnologías que permitan su elaboración a nivel industrial. Dichas levaduras deberán tener la capacidad de resistir los procesos tecnológicos requeridos para su producción, manteniendo la viabilidad y las propiedades benéficas, no solamente luego del proceso de elaboración, sino que también durante el almacenamiento (Cassani et al., 2020).

Dentro de las estrategias comúnmente empleadas en la preservación de microrganismos pueden mencionarse la refrigeración y congelación (criopreservación), la deshidratación (secado por spray, extrusión) y también métodos que combinan por ejemplo congelación y deshidratación (liofilización) (Kiepś, J., & Dembczyński, R. 2022).

La **criopreservación** se utiliza para preservar y almacenar cultivos microbianos en el laboratorio mediante el almacenamiento de repiques en medios sólidos a 4°C es usualmente empleado para el mantenimiento de stocks de trabajo durante semanas, mientras que la conservación a menor temperatura entre -20°C y – 80°C es empleada para preservación durante periodos más prolongados. Desde un punto de vista comercial, estos métodos tienen desventajas, que incluyen principalmente altos niveles de consumo de energía y la necesidad de mantener y transportar las muestras a temperaturas bajo cero.

El **secado en spray** es un proceso donde el líquido es atomizado en forma de gotas dentro de una cámara y transformado en “polvo” por acción del calor y el agua contenida en la muestra se elimina por evaporación por contacto con una fase gaseosa a alta temperatura. Además de ser una técnica empleada a gran escala para la elaboración de productos alimenticios, como leche en polvo, bebidas deshidratadas, sopas y café instantáneo, es un proceso muy utilizado y con muchas ventajas para la producción de deshidratados microbianos. Esta metodología se ha empleado para deshidratar y conservar bacterias lácticas, para ser usadas como cultivos *starters* (para yogurt o queso), cultivos productores de bacteriocinas y cultivos probióticos (Gardiner et al., 2000; Silva et al., 2011; Huang et al., 2017; Tejeiro et al., 2018; Kiepś, J., & Dembczyński, R. 2022)

El proceso de secado spray se puede dividir en varias etapas. En la primera, la suspensión líquida es bombeada hacia una tobera donde se atomiza al entrar en contacto con un gas a alta presión. En una segunda etapa, la suspensión atomizada en pequeñas gotas entra en contacto con un aire caliente. 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, siendo la co-corriente la elegida para microorganismos sensibles al calor. En este patrón, las gotas más húmedas entran en contacto con la temperatura más alta y las partículas más secas con temperaturas inferiores, minimizando así el riesgo de daño por calor a los microorganismos. Durante el proceso, las gotas van perdiendo agua por evaporación hasta quedar los sólidos remanentes como partículas secas. En una tercera y última etapa, las partículas gruesas y pesadas quedan en la base de la cámara de secado por fuerza gravitacional y las partículas finas se separan usando ciclones y filtros de bolsa (Broeckx et al., 2016). El polvo recogido en el recipiente recolector es un polvo listo para usar .

Las condiciones operativas seleccionadas para la realización del deshidratado, como son la temperatura de entrada, la temperatura de salida, la presión de atomización son parámetros muy importantes porque determinan la viabilidad del microorganismo. Además, las condiciones operativas determinan el contenido de humedad del producto final y con ella la calidad del polvo. Autores como Zayed & Roos (2004), indican que la humedad debe ser próxima al 3,5% para asegurar un producto seco estable en el tiempo.

La principal ventaja que presenta este tipo de tecnología es la posibilidad de obtener grandes cantidades de producto deshidratado con un costo relativamente bajo, que puede ser transportado fácilmente y almacenado a temperatura ambiente durante largos períodos (Gardiner et al., 2000; Silva et al., 2011; Kiepś, J., & Dembczyński, R. 2022).

La **extrusión** es un proceso que combina diversas operaciones unitarias como el mezclado, la cocción, el amasado y el moldeo y permite a partir de ingredientes básicos y variados, obtener alimentos de distinta forma, textura y color. Como ejemplo pueden mencionarse la obtención de pastas, cereales, productos de confitería, algunos alimentos para bebés, proteína vegetal texturizada, piensos, alimentos balanceados para animales de producción y mascotas. La peletización es un proceso de extrusión forzada (presión) de una mezcla previamente acondicionada en cuanto a humedad y temperatura, a través de un molde o matriz con orificios que le da la forma comúnmente cilíndrica. Se obtienen así pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido conocidas en el mercado como *pellet,* del latín “pila, bola o pelota”. Esta metodología es utilizada en la fabricación de productos muy diversos, desde plásticos,

insecticidas hasta alimentos balanceados. Según el producto que se quiera obtener se definen los pasos del proceso, en el caso de alimentos balanceados, durante el mezclado de ingredientes se añade vapor, que además de agregar humedad a la mezcla implica una etapa de cocción que favorece la destrucción de inhibidores enzimáticos y microorganismos sensibles al calor y mejoras en la digestibilidad del alimento. Sin embargo, no todos los procesos de peletización requieren de la inyección de vapor caliente, en algunos casos, se prepara una pasta con inyección de agua en estado líquido y luego se utilizan mezcladoras en vacío para realizar la homogenización sin incorporar aire y generar una masa de fluidez suficiente. La masa es arrastrada por un tornillo que atraviesa el dado, sale con la forma determinada por el orificio y es cortada por cuchillas que pueden graduarse a velocidad. A continuación, el pellet generado es transportado por túneles de secado (Jacobsen et al., 2020; Amin et al., 2023).

La **liofilización** es un método de desecación en el que se elimina el agua por congelación y posterior sublimación del hielo, en condiciones de vacío. Por lo tanto, el agua pasa directamente de un estado sólido al estado de vapor (Casp & Abril 1999). Es una de las técnicas más generalizadas para la deshidratación de probióticos y cultivos lácticos. Este método presenta numerosas ventajas debido principalmente a que el producto se somete a temperaturas de congelación que pueden variar entre -45 y -80°C, pero no son calentadas como en el caso del proceso de secado spray o extrusión y se obtienen productos secos con una humedad residual baja, con buena estabilidad durante el almacenamiento por largos períodos y sin necesidad de cadena de frío para su distribución. Por el contrario, este suele ser un proceso de alto costo que deriva de los equipos que se utilizan, la elevada energía empleada y el tiempo que insume el mismo (Johnson & Etzel, 1995).

Los productos liofilizados vuelven a su estado original luego de la rehidratación y por eso es un método apropiado para conservar microorganismos y su actividad biológica. Entre las aplicaciones más comunes se pueden mencionar: elaboración cápsulas de administración oral, cultivos iniciadores en la industria, kéfir, levaduras y otras bacterias del ácido láctico; suplementos funcionales en productos alimenticios, por ejemplo, levadura de cerveza y probióticos y agentes de biocontrol como biopesticidas y bioconservantes, por ejemplo, *Lactobacillus plantarum, Bacillus thuringiensis* ssp*. aizawai*, y *Beauveria brongniartii* (Horaczek & Viernstein, 2004; Fu & Chen 2011). En comparación con un cultivo líquido, el cultivo en forma seca ofrece ventajas como un transporte más fácil y un mejor control de calidad.

Durante los procesos de deshidratación, los microorganismos están expuestos a diferentes tipos de estrés, entre ellos el estrés térmico, osmótico, oxidativo y el daño mecánico por formación

de cristales de hielo, entre otros. En la actualidad numerosos trabajos presentan diferentes estrategias para abolir los daños causados por estas situaciones de estrés, entre las cuales podemos citar: 1) la selección de los parámetros más adecuados del proceso, 2) adaptación del microorganismo a los factores de estrés previo al secado y 3) la utilización de sustancias protectoras. Estas medidas preventivas afectan la supervivencia de los microorganismos probióticos directamente durante secado, así como después del secado durante el almacenamiento (Kiepś & Dembczyński, 2022). De acuerdo con el tipo de proceso elegido, el microorganismo y la matriz utilizada, se selecciona la estrategia más adecuada de trabajo. En lo que respecta a la utilización de sustancias protectoras, se pueden mencionar mono y di-sacáridos, leche desnatada, proteínas del suero, inulina, trehalosa, oligosacáridos y polímeros, como la goma arábiga, entre otros (Zhao & Zhang, 2005, Gaidhani et al., 2015, Broeckx et al., 2016). La micro/nano encapsulación es otras de las estrategias que se presenta como una alternativa en la preservación de microorganismos viables no sólo durante el procesamiento de los alimentos, el almacenamiento, sino también durante el posterior delivery en el consumidor. (Kwak et al., 2014; Braber et al., 2020). En la microencapsulación los probióticos quedan recubiertos completamente por una matriz o pared. Para generar estos revestimientos se pueden utilizar diversos biopolímeros, como goma arábiga, alginato, proteínas de leche o suero, proteína de soja, gelatina, gluten, fibras dietéticas como almidón resistente, almidón de maíz, polisacáridos microbianos y animales como quitosano, xantano , entre otros (Braber et al., 2020; Rajam et al., 2022).

La conservación de microorganismos implica garantizar su viabilidad, pureza y estabilidad genética por lo que establecer un buen método resulta relevante para cada cepa en particular. En el caso de los probióticos, el hecho de que una cepa crezca bien en condiciones de laboratorio no significa que vaya a suceder lo mismo en condiciones industriales. En este sentido, la producción de un concentrado de levaduras probióticas debe, además de obtener gran cantidad de biomasa de forma económicamente rentable, enfrenta el desafío tecnológico de que la concentración de microorganismos viables sea la necesaria para ejercer el efecto beneficioso y se mantenga hasta el final de la vida útil del producto.

OBJETIVOS

Los procesos a los que son sometidos los microorganismos durante la producción de alimentos pueden alterar su funcionalidad biológica. *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 crecida en permeado de suero de quesería resiste las condiciones adversas del tracto gastrointestinal y presenta capacidad inmunomoduladora de la respuesta inmune innata, entre otras características atractivas para su empleo como probiótico. El objetivo del presente capítulo fue seleccionar un método que permita obtener un producto deshidratado a base de levadura probiótica para ser utilizado solo o como suplemento de un nuevo alimento funcional.

Objetivos específicos

- Investigar la supervivencia de *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 sometida a diferentes métodos de conservación: refrigeración, secado spray, extrusión y liofilización.
- Optimizar el proceso de deshidratación de levaduras probióticas mediante la utilización de compuestos con actividad termoprotectora.
- Monitorear el comportamiento de los distintos productos deshidratados respecto a su viabilidad microbiana y actividad inmunomodulatoria durante el almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de biomasa húmeda

Se obtuvo biomasa húmeda de *K. marxianus* CIDCA 9121 siguiendo las condiciones propuestas para los procedimientos de obtención en fermentador de 5 y 15 L detallado en Capítulo 2.

3.2. Ensayo de conservación a 4°C

Se evaluó la viabilidad de la levadura CIDCA 9121 durante el almacenamiento a 4°C. La biomasa de levadura obtenida por centrifugación luego de crecimiento en permeado de lactosuero (ver detalles Capitulo 2), se conservó en tubos falcon de 50 ml estériles en heladera a 4ºC y se realizaron recuentos de levaduras viables por técnica de la gota durante 3 meses.

3.3. Secado Spray

Los ensayos se llevaron a cabo utilizando un equipo BUCHI Mini Spray Dryer B-290, que posee un funcionamiento co-corriente (Figura 3.1). Las condiciones operativas de secado fueron: temperatura de entrada de 135°C con un flujo de aire de 473 l/h y un flujo de alimentación de 10 ml/min con un flujo de aire de aspirador de 100% y caudal de alimentación de 30%, con una temperatura de salida de 69±4°C.

Figura 3.1: Fotografía del equipo para secado spray escala laboratorio utilizado para el presente trabajo de tesis BUCHI Mini Spray dryer B-290.

Las muestras sometidas al proceso de secado se prepararon resuspendiendo 0,1, 1 y 10 g de biomasa de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 crecida en permeado de lactosuero resuspendida en solución fisiológica o permeado de lactosuero al 20% p/. Las suspensiones se homogenizaron

agitando vigorosamente y se termostatizaron a temperatura ambiente. Se realizó recuento de levaduras viables por técnica de la gota en las suspensiones antes del secado y en los polvos obtenidos inmediatamente después del proceso y durante almacenamiento a 25ºC. Además, se determinó la actividad acuosa y la humedad porcentual de la biomasa húmeda y de los polvos secos.

3.4. Extrusión

3.4.1 Selección de agente termoprotector

Se trabajó en primer instancia en un proceso de extrusado a escala laboratorio a fin de seleccionar distintas combinaciones de termoprotectores que luego serian llevados a prueba a mayor escala. El proceso de extrusado se realizó sobre una base de masa generada a partir de harina de grano de trigo entero y agua tal como la empleada en procesos industriales de extrusión de microorganismos de uso en agricultura. Se trabajó mediante extrusión manual empleando una jeringa de 20 mL de capacidad como emulación de un extrusado industrial, procediendo luego al secado del producto en distintas condiciones. Empleando este sistema, se evaluó el efecto termoprotector de ocho compuestos: sacarosa, maltosa, maltodextrina, suero, gelatina, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP) y glicerol. El ensayo se llevó a cabo utilizando un *Diseño de Cribado definitivo*, donde se analizaron 3 concentraciones (alta , baja e intermedia) y se utilizó el diseño experimental de *Plackett-Burman* para evaluar la importancia de múltiples variables en las composiciones sobre la supervivencia del probiótico. Los factores y niveles evaluados se presentan en la Tabla 3.2 para los ocho compuestos (parámetros) y en total se realizaron 17 corridas. Las masas se formularon con el mismo contenido de levadura inicial y se sometió a un proceso de extrusión simulado con jeringa. Los pequeños bastones obtenidos se secaron en estufa a 37°C durante 17 horas. Se evaluó la viabilidad de las levaduras antes y después del proceso térmico mediante recuentos de UFC/g de masa utilizando la técnica de recuento en gota en medio YGC (Figura 3.2).

Posteriormente, en un nuevo experimento se utilizó un *Diseño de Box Behnken con superficie de respuesta* en el que se evaluó la actividad termoprotectora de sacarosa, maltosa y maltodextrina Se utilizó este diseño experimental con el fin de ajustar las concentraciones de los agentes termoprotectores seleccionados, utilizando los mismos procedimientos, pero con una condición de secado a 60 ºC durante 60 minutos.

Figura 3.2: Ensayo de selección de termoprotector mediante proceso simulado de extrusión y secado a escala laboratorio.

3.4.2. Extrusión en planta industrial

Los termoprotectores y condiciones seleccionadas en los ensayos de laboratorio se probaron en un equipo industrial de generación de extruidos comerciales. El proceso de extrusión y secado se llevó a cabo en la planta industrial *AgriGlobal Crop Solutions* (ACAY AGRO S.A., Balcarce, Buenos Aires). Se empleó una técnica registrada "Técnica de extrusión Agriglobal" que consta de una extrusión húmeda, donde la pasta a extrusar se prepara en mezcladoras de cinta con vacío, una vez homogeneizada es arrastrada por tornillo simple hasta un dado con perforaciones de 1,5 mm de diámetro y el pellet generado es transportado por cintas por túneles de secado. Los pellets obtenidos se secaron en horno de túnel continuo a 60°C durante 150 min.

3.5. Liofilización

Se prepararon suspensiones de biomasa de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 en diferentes concentraciones de permeado de lactosuero 0, 10 y 20% p/V y se liofilizaron en un equipo FIC L-I-E300-CRT con presión de vacío <13.32Pa, temperatura del condensador -35°C y de los estantes 22°C (Figura 3.3, A). Los liofilizados obtenidos se almacenaron en tubos falcon estériles de 50 ml a temperatura ambiente y se realizaron recuentos de levadura viable a diferentes tiempos. La liofilización se llevó a cabo empleado diferentes equipos de liofilización (Figura 3.3) de acuerdo con el volumen de biomasa a procesar.

A. **B.**

Figura 3.3: **A**.Liofilizador modelo FIC L-I-E300-CRT **B**.Liofilizador RIFICOR L-I-E260- CR

3.5.1 Selección de agente lioprotector

Se evaluó el efecto de la adición de sacarosa, maltosa, maltodextrina y suero de quesería sobre la viabilidad de la levadura durante el proceso de liofilización. Las formulaciones ensayadas se prepararon mezclando 5g de biomasa de levadura CIDCA 9121 con 10 ml de suspensión de cada compuesto al 20%. Como control, se preparó una mezcla de biomasa con agua destilada. Las cinco formulaciones obtenidas se liofilizaron en un equipo de escala piloto RIFICOR L-I-E260- CR (Figura 3.3,B) con presión de vacío de 16 Pa y temperatura de condensador de -35°C. Las muestras se retiraron del liofilizador cuando se alcanzó una temperatura constante. Se realizaron recuentos de levadura en medio YGC por técnica de la gota en las muestras antes, después del proceso de liofilización y a diferentes tiempos durante su almacenamiento de temperatura ambiente.

3.6. Determinación de actividad acuosa

La actividad de agua (a_w) de los polvos obtenidos tras el proceso de secado se midió utilizando un equipo Aqualab 4TEV (Decagon Devices, EE.UU), mediante el método del punto de rocío a 25°C. Las muestras se estabilizaron a temperatura ambiente antes de llevar a cabo las mediciones. Para la calibración del equipo, se emplearon soluciones estándar proporcionadas por el fabricante.

3.7. Determinación de humedad porcentual

El contenido de humedad se determinó colocando 2 g de muestra en cajas de vidrio previamente pesadas. Para la muestra de biomasa humedad además se adicionó 1 g de arena previamente lavada y calcinada y se homogeneizó bien con la pasta para que el desprendimiento de agua sea más rápido y uniforme. Luego se llevaron a estufa a 105°C hasta peso constante y se calculó la humedad porcentual con la siguiente fórmula:

$$\%Humedad = \frac{(pi - pf)}{pi} * 100$$

Donde *pi* y *pf* son los pesos de las muestras antes y después de la deshidratación a 105°C, respectivamente.

3.8. Capacidad inmunomoduladora de levadura deshidratada

Se evaluó la capacidad inmunomoduladora de la levadura CIDCA 9121 luego de ser sometida a los diferentes métodos de deshidratación. En todos los casos se incluyó en un control de biomasa húmeda de levadura CIDCA 9121. Todos los experimentos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo detallado en el Capítulo 1, ajustando las suspensiones de levadura a una concentración de $1x10^7$ UFC/ml.

Los productos deshidratados fueron resuspendidos en solución fisiológica y homogeneizados durante 1 hora. Luego se prepararon diluciones en medio DMEM y se agregaron a las fosas con células Caco-2 ccl20:luc. En el caso de la levadura extrusada, el ensayo se realizó a partir de colonias crecidas en medio YGC de levadura CIDCA 9121 recuperadas de los pellets obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Tal como se mencionó en la introducción existen diversas técnicas para conservar microorganismos, sin embargo, los trabajos acerca de la preservación de probióticos se dedican en su mayoría a bacterias y en especial a lactobacilos (Broeckx et al., 2017; Ningtyas et al., 2019; Bhagwat et al., 2020; Kiepś & Dembczyński, 2022). En este trabajo se exploraron distintas estrategias para optimizar el rendimiento en la conservación de la levadura probiótica.

Ensayo de criopreservación de *K. marxianus* CIDCA 9121

La conservación de levaduras por refrigeración a 4°C es una de las técnicas más ampliamente utilizadas en el almacenamiento de cepas en el laboratorio e industrialmente para la comercialización de levaduras para panificados, por ejemplo. Es una metodología que presenta ciertas ventajas para su implementación debido a que no requiere de la utilización de equipos sofisticados y tampoco implica tratamientos térmicos que puedan tener un impacto negativo en la fisiología del microorganismo. Sin embargo, no todos los microorganismos son capaces de sobrevivir largos periodos de almacenamiento a 4°C, por lo que fue necesario el estudio de la sobrevida de *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 obtenida como se detalló en el Capítulo 2. Los resultados presentados en la Figura 3.4 muestran que la biomasa de la levadura CIDCA 9121 puede conservarse refrigerada sin modificar significativamente el recuento de viables manteniendo en un valor de 3,8 x 10^9 UFC/g durante 3 meses de almacenamiento a 4°C.

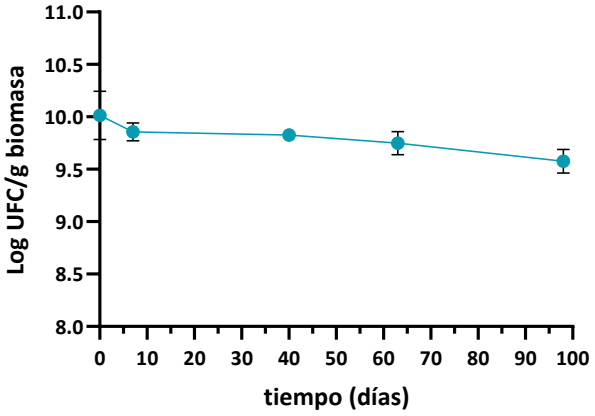


Figura 3.4: Supervivencia de *K. marxianus* CIDCA 9121 almacenada a 4ºC.

El método de conservación elegido para una levadura con capacidad probiótica debe garantizar que la viabilidad y las propiedades funcionales no se pierdan durante el almacenamiento. Debido a esto se evaluó la respuesta inmumoduladora a nivel intestinal *in vitro* utilizando el sistema reportero Caco-2 ccl20:luc, detallado en el Capítulo 1. Los resultados obtenidos demostraron que la biomasa de levadura CIDCA 9121 no solo mantiene su concentración de

células viables, sino que también logra disminuir en un 80% la respuesta inflamatoria intestinal *in vitro* al cabo de 3 meses de almacenamiento a 4°C.

Si bien la criopreservación permitió la conservación de la biomasa húmeda de *K. marxianus* CIDCA9121 por varios meses sin fluctuaciones significativas en la concentración de viables ni alteración de su actividad probiótica , este método presenta ciertas desventajas que incluyen los altos niveles de consumo de energía y la necesidad de transporte y mantenimiento a bajas temperaturas, lo que implica un alto costo desde el punto de vista comercial (Kiepś & Dembczyński, 2022). Es así, que se exploró el uso de procesos tecnológicos alternativos que permitan una conservación a largo plazo (meses- años) y con menor costo de producción y mantenimiento.

Evaluación de la deshidratación de *K. marxianus* CIDCA 9121 por secado spray

El secado spray es una técnica rápida y relativamente económica que permite obtener partículas de polvo secas, con buenas propiedades de flujo, forma uniforme, y distribución del tamaño de partículas (Dos Santos et al., 2014). Como se mencionó en la introducción, el principal factor de estrés que afecta la viabilidad de los microorganismos sometidos a proceso de secado spray es el estrés térmico, causado principalmente por la temperatura de salida (Kiepś & Dembczyński , 2022; Vorländer et al., 2023). En trabajos previamente publicados se ha registrado que levaduras aisladas de kefir son drásticamente afectadas por la deshidratación por secado spray, pero no así las bacterias lácticas presentes. Esto da cuenta, que el éxito del proceso va a estar determinado no solo por las condiciones seleccionadas sino también por la termotolerancia de los microorganismos con los que se esté trabajando. (Golowczyc et al.,2009). Para minimizar el daño y obtener productos más estables, habitualmente se utilizan diversos termoprotectores como proteínas de suero, trehalosa, glutamato monosódico, sacarosa, glucosa, inulina, lactosa y oligosacáridos para aumentar la supervivencia de las bacterias durante este proceso (Corcoran et al., 2004; Desmond et al., 2002; Sunny-Roberts & Knorr, 2009; Teijero et al., 2018)
La levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 aislada de kefir de agua crecida en permeado de lactosuero fue sometida a proceso de secado spray bajo las siguientes condiciones: temperatura de entrada de 135ºC, un caudal de alimentación de alimentación del 30%, flujo de aire de 100% (aproximadamente 30 m3/h) para garantizar una correcta separación de las partículas en el ciclón y un *air Flow* que se mantuvo lo más alto posible (473 l/h) para asegurar la correcta atomización en la tobera. En estas condiciones la temperatura de salida fue de 69±4°C.

Para evaluar el efecto termoprotector de permeado de lactosuero se prepararon suspensiones con igual concentración inicial de biomasa de levadura (1x10^{10} UFC/g) en 100 ml de solución fisiológica o en 100 ml de solución permeado de lactosuero 20% p/v, y se sometieron al proceso de secado spray en las condiciones previamente descriptas. Tal como se muestra en la Figura 3.5 A, la deshidratación por secado spray sin el empleo de sustancias protectoras produce un impacto negativo en la viabilidad de la levadura *K. marxianus* CIDCA 9121, que desciende 6 unidades logarítmicas al final del proceso. La adición de permeado al 20% a la suspensión sometida al secado mejoró significativamente la supervivencia de la levadura, con una disminución de tan solo 2,5 unidades logarítmicas al final del proceso.

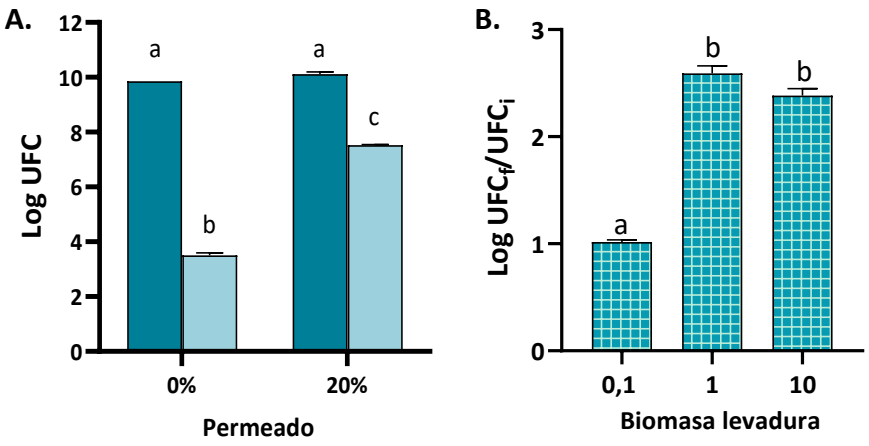


Figura 3.5: **A**) Recuento de levadura viable *K. marxianus* CIDCA 9121 antes (barras oscuras) y después (barras claras) del secado spray para suspensiones de levaduras preparadas en solución fisiológica (0%) y en permeado de lactosuero al 20%. **B**) Supervivencia de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 en los productos deshidratados formulados a partir de suspensiones de 0,1g, 1g y 10 g de biomasa de levadura en 100 ml de permeado de lactosuero al 20% expresados como diferencia logarítmica entre recuento final e inicial. Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$).

Además, se observó que el aumento en la concentración de levaduras iniciales en las suspensiones no produce una mejoría en la sobrevida de la levadura al secado, obteniéndose menores descensos en la viabilidad cuando la suspensión fue preparada a partir de 0,1 g de biomasa (10^7 UFC/ml de solución permeado al 20% p/v) (Figura 3.5, B).

Luego de la deshidratación por secado spray los polvos de levadura obtenidos alcanzaron un valor de humedad fue 12-18%, y una actividad acuosa de 0,22- 0,28. Teniendo en cuenta que la biomasa húmeda de levadura CIDCA 9121 obtenida por centrifugación contiene una humedad del 72% y una actividad acuosa de 1, podría decirse que el proceso de deshidratación fue efectivo en la eliminación de agua. Generalmente, los alimentos con a_w<0,6 se consideran microbiológicamente estables y si se produce algún deterioro, es inducido por reacciones

químicas en lugar de por microorganismos (Quek et al., 2007). Otros autores, han reportado que la actividad del agua debe ser inferior a 0,25 y el contenido de humedad debe estar entre valores de 4 y 7% para un almacenamiento seguro de polvos con microorganismos probióticos (Ananta et al., 2005; Chàvez & Ledeboer, 2007; Reale et al., 2019). Si bien los valores de a_w obtenidos están dentro del rango esperado, aun el contenido de humedad es elevado y esto puede traer implicancias negativas en la estabilidad de la levadura seca durante el almacenamiento por periodos prolongados. La importancia de obtener productos con bajo contenido de humedad y actividad acuosa está relacionada con la temperatura de transición a fase vítrea (Tg). Cuando la temperatura de almacenamiento es superior a la Tg, el producto cambia de un estado vítreo a un estado gomoso, y la movilidad de las moléculas y la velocidad de las reacciones químicas están menos restringidas. Este aumento de la movilidad molecular desestabiliza el material biológico conduciendo a una pérdida de viabilidad de los microorganismos probióticos y a una disminución de la vida útil del producto almacenado (Cerruti et al., 2000; Schutyser et al., 2012; Teijeiro et al.,2018; Ribert et al, 2021). Es así, que productos con menor contenido de humedad y actividad acuosa presentan una mayor Tg, con lo cual permiten su almacenamiento a temperaturas más elevadas, tales como T° ambiente empleado en este trabajo. En la Figura 3.6 se muestran los resultados del estudio de estabilidad al almacenamiento de los polvos de levadura CIDCA 9121 obtenidos por secado spray. Este ensayo permitió determinar que la adición de permeado de lactosuero a las formulaciones ensayadas mejoró significativamente la sobrevida de la levadura en los polvos deshidratados, observándose un descenso máximo de 1,9 unidades logarítmicas al cabo de 42 días de almacenamiento a 25°C.

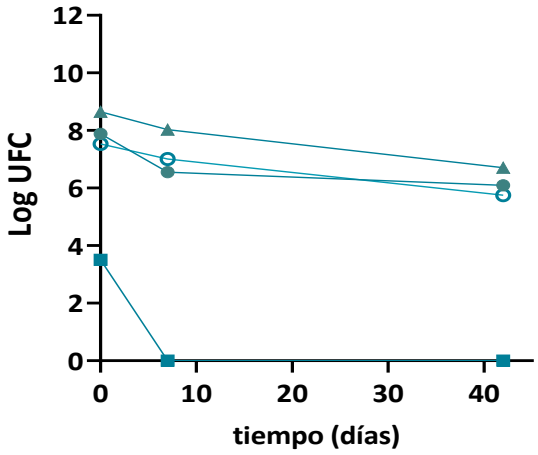


Figura 3.6: **Estabilidad de levadura en polvos deshidratación durante almacenamiento a 25 °C durante 42 días.** Recuento de levadura viable *K. marxianus* CIDCA 9121 en polvos deshidratados obtenidos a partir de formulaciones con concentración inicial de 10^7UFC/ml (circulo vacío), 10^8 UFC/ml(círculo azul) y 10^9 UFC/ml con permeado de lactosuero al 20% p/v (triángulo) y una formulación de concentración 10^8 UFC/ml sin permeado de lactosuero (cuadrado).

El gran desafío del secado spray de microorganismos probióticos sigue estando en la optimización de las condiciones del proceso, en especial, la temperatura de salida, que debe ser lo suficientemente alta para generar una buena deshidratación de la muestra, pero a la vez que no produzca daño celular. La importancia de este breve recorrido realizado utilizando esta técnica de deshidratación nos permitió registrar que es posible la obtención de un producto deshidratado por secado spray con levadura *K marxianus* CIDCA 9121 con una concentración final de 10^7 UFC/g utilizando permeado de lactosuero 20% p/v como agente termoprotector. El uso de permeado de lactosuero además de mejorar significativamente la supervivencia de la levadura *K. marxianus* CIDCA 9121, mejoró la estabilidad de la levadura durante 42 días de almacenamiento a 25°C. Aún queda continuar con ensayos que permitan dilucidar el mecanismo mediante el cual este agente ejerce su protección y evaluación de actividad probiótica de la levadura deshidratada en estas condiciones.

Estudio de factibilidad de la extrusión y peletizado de *K. marxianus* CIDCA 9121

La importancia de poder explorar la extrusión y peletizado como metodología de secado radicó fundamentalmente en vista de la implementación de la levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 como probiótico en la industria de producción animal. En general, la mayoría de las levaduras probióticas de uso animal disponibles en el mercado aparecen como aditivos en forma de polvo seco, generado por secado spray o liofilización. Este formato es apropiado para la suplementación bovina o porcina, sin embargo, para otras aplicaciones como acuicultura o producción avícola, es deseable el uso de alimento granulado y la inclusión del probiótico en los gránulos (Massuquetto et al., 2019, 2020; Sribounoy et al., 2021). Durante este proceso, las altas temperaturas y también la desecación pueden afectar la viabilidad de los microorganismos y, en consecuencia, sus características probióticas. La deshidratación de microorganismos incluso a baja temperatura puede tener efectos importantes ya que las moléculas de agua son esenciales para el mantenimiento de diferentes estructuras biológicas (Ananta et al., 2005; Oliver et al., 1998). Por este motivo se evaluó la capacidad de diferentes compuestos termoprotectores putativos en la obtención de *K. marxianus* CIDCA 9121 en un proceso de extrusión y peletizado simulado a escala laboratorio.

En un primer ensayo, se utilizó un diseño de Placket- Burmann considerando ocho candidatos termoprotectores en tres concentraciones o niveles diferentes, lo que resultó en 17 condiciones de prueba. Las masas se secaron a temperatura constante de 37ºC y se contaron las levaduras

viables después de 17 horas de secado. Los resultados de la levadura viable recuperada en cada condición se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Recuentos de levadura recuperada (log UFC/g) en los diferentes ensayos del diseño Placket Burman. Cada ejecución numerada del 1 al 17 implica una combinación diferente de supuestos agentes termoprotectores; +/-/0 indica la concentración más alta/mínima/intermedia de los diferentes agentes.

N°	Sacarosa	Glicerol	Maltosa	Maltodextrina	Suero	Gelatina	PVP	PEG	Log CFU/g
1	-	-	-	0	+	-	+	+	4,09
2	-	+	-	-	+	+	-	0	-
3	+	+	-	-	-	0	+	+	-
4	+	+	+	0	-	+	-	-	7,44
5	-	-	+	+	+	0	-	-	5,15
6	-	-	+	-	-	+	0	+	4,22
7	+	0	+	-	+	-	-	+	6,16
8	0	+	+	+	+	+	+	+	4,36
9	-	+	0	+	-	-	-	+	3,35
10	+	+	-	+	+	-	0	-	7,77
11	+	-	-	+	0	+	-	+	5,81
12	-	+	+	-	0	-	+	-	6,74
13	-	0	-	+	-	+	+	-	6,34
14	0	0	0	0	0	0	0	0	6,17
15	0	-	-	-	-	-	-	-	5,99
16	+	-	0	-	+	+	+	-	6,93
17	+	-	+	+	-	-	+	0	7,21
18				Control levadura					6,62
19				control					-

Considerando que la concentración inicial de levadura en cada masa fue de 7,35 unidades logarítmicas de UFC/g, podemos observar que varias condiciones permitieron recuperar casi la totalidad de la levadura viable (corridas 4, 10 y 17). Algunas combinaciones de aditivos incluso mejoraron la recuperación de levaduras viables en el producto final en comparación al control sin aditivos (corridas 4, 10, 12, 16 y 17), mientras que otras combinaciones, , mostraron un efecto negativo sobre este parámetro (corridas 2, 3, 6 y 9). El análisis de regresión realizado con Minitab dio como resultado la siguiente ecuación que es válida en los rangos de concentraciones y condiciones utilizadas en el experimento:

$$Viabilidad = 5{,}17 + 0{,}0908x\ Sacarosa - 0{,}0757x\ Glicerol + 0{,}176x\ Maltosa + 0{,}155x\ Maltodextrina - 0{,}0008x\ Suero - 9{,}7x\ Gelatina + 2{,}8x\ PVP - 0{,}580x\ PEG$$

En este caso, sólo la contribución lineal de cada factor se ajustó adecuadamente a los datos generados. Esta contribución es positiva o negativa según su impacto en la ecuación y el impacto

relativo se puede evaluar según la magnitud de cada coeficiente. Para determinar qué tan significativa fue la contribución de cada factor, se realizó un análisis de Pareto (Figura 3.7) donde pudo observarse que la contribución más significativa fue el impacto negativo del PEG. Curiosamente, varios factores como la sacarosa, la maltosa y la maltodextrina tuvieron una contribución positiva que, aunque no fue significativa, las postuló como interesantes candidatos para un análisis más profundo.

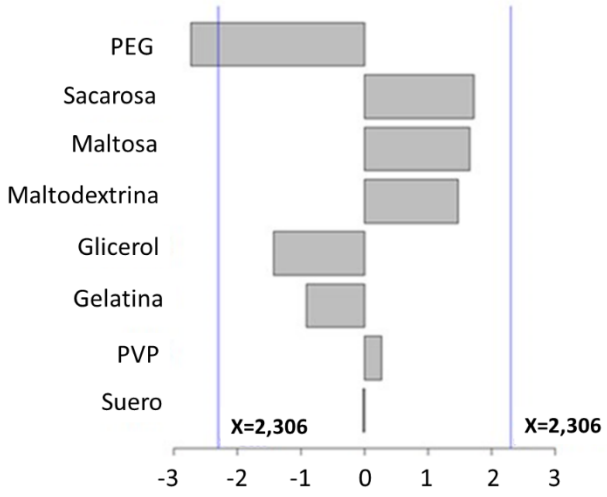


Figura 3.7: Análisis de Pareto del experimento de diseño de Plackett-Burman. Se indica el nivel de significancia correspondiente a un valor absoluto de 2,306.

En consecuencia, decidimos evaluar el aporte de estos tres aditivos utilizando un diseño Box-Behnken y realizando la operación de secado a una temperatura más estricta, equivalente a las condiciones industriales. En este experimento, el rango de concentraciones probadas para los tres aditivos se amplió en comparación con nuestro experimento inicial. La concentración media utilizada para cada agente termoprotector fue la concentración más alta utilizada en el experimento anterior y el secado se realizó a 60 °C durante 60 minutos.

Los recuentos de levadura recuperada en cada condición se muestran en la Tabla 3.3. Considerando que la concentración de levadura en la masa antes del secado fue de 7,83 log UFC/g, se obtuvo una recuperación de más del 50 % luego del secado (corridas 4 y 10) y en varias condiciones, se observó un efecto positivo de los agentes termoprotectores (corridas 1, 3 a 12 y 15) con respecto al control sin aditivos de la corrida 16.

Tabla 3.3: Recuento de levadura recuperada. Cada ejecución implica una combinación diferentes agentes termoprotectores; -1/0/+1 indica respectivamente la concentración más baja/intermedia/más alta de los diferentes agentes empleados.

N°	Maltosa	Maltodextrina	Sacarosa	Log UFC/g
1	0	0	0	7,35
2	0	-1	-1	6,60
3	0	1	-1	7,12
4	0	-1	1	7,51
5	1	-1	0	7,34
6	-1	1	0	7,17
7	1	0	1	7,40
8	0	0	0	7,31
9	-1	0	-1	7,15
10	-1	0	1	7,52
11	0	0	0	7,41
12	1	1	0	7,20
13	0	1	1	6,99
14	-1	-1	0	7,43
15	1	0	-1	7,36
16		Control levadura		7,02
17		control		-

En este caso, el análisis de regresión de las diferentes combinaciones incluyó interacciones de segundo orden entre las diferentes variables ensayadas, dando como resultado la siguiente ecuación que representa los resultados generales:

$$Viabilidad = 7{,}355 + 0{,}0047x\ Maltosa - 0{,}0482x\ Maltodextrina + 0{,}1471x\ Sacarosa + 0{,}1157x\ Maltosa * Maltosa - 0{,}1868x\ Maltodextrina * Maltodextrina - 0{,}1136x\ Sacarosa * Sacarosa - 0{,}2591x\ Maltodextrina * Sacarosa$$

El análisis de Pareto reveló contribuciones positivas y negativas de los compuestos individualmente e interacciones de primer y segundo orden con efectos positivos y negativos (Figura 3.8).

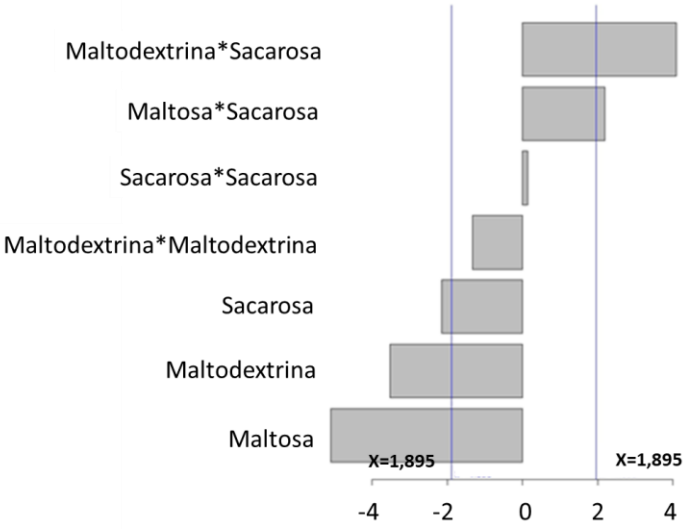


Figura 3.8: Análisis de Pareto del experimento de diseño Box-Behnken. Los efectos con módulos superiores a 1,895 se consideraron con impacto significativo.

Los efectos de las diferentes variables analizadas también se pudieron visualizar en gráficas de superficie de respuesta, donde la curvatura en las gráficas muestra el efecto de las interacciones no lineales entre los diferentes agentes (Figura 3.9). Los resultados generales indicaron que podría haber diferentes condiciones que muestren efectos positivos. Sin embargo, dado que el efecto de un solo termoprotector muchas veces mostró un impacto negativo, se concluyó que las condiciones que implican un mejor desempeño deben incluir una combinación de ellos.

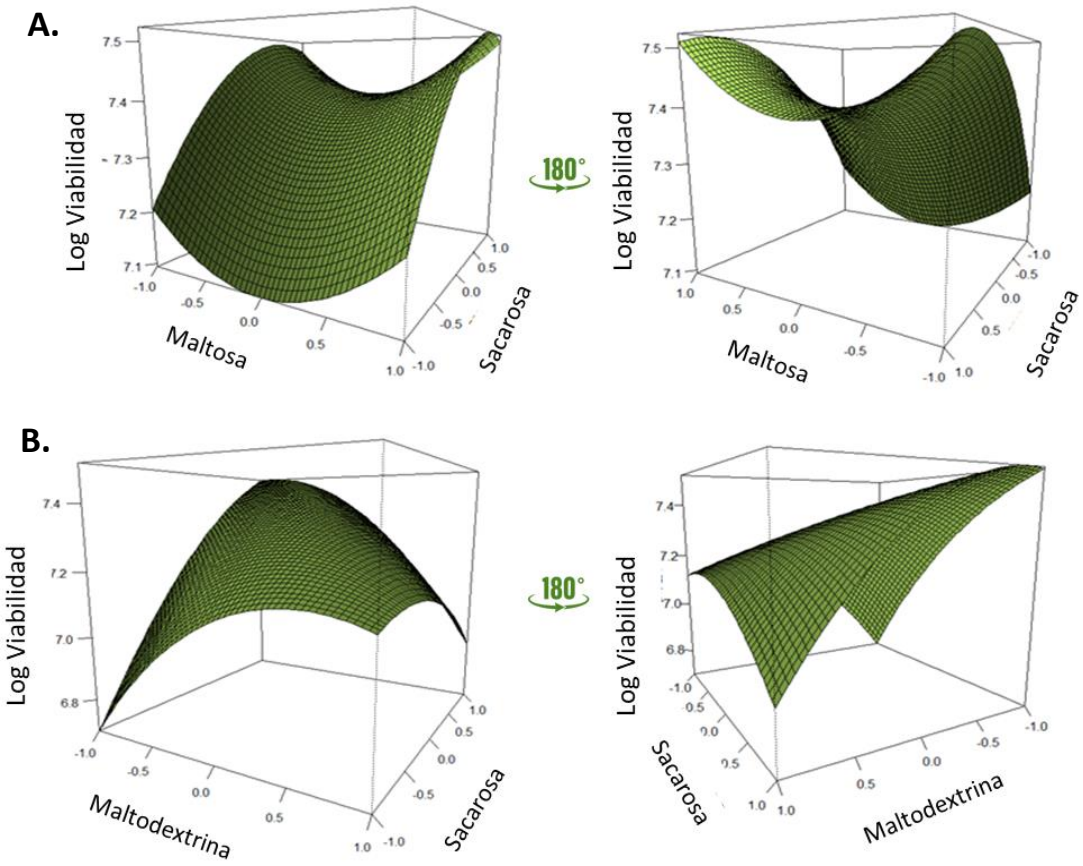


Figura 3.9: Superficie de respuesta de la viabilidad trazada frente a dos agentes protectores diferentes a la vez. **A**.Efecto de los cambios en las variables maltosa y sacarosa en dos representaciones diferentes de la misma superficie de respuesta con una rotación de 180◦ entre sí. **B**.Efecto de los cambios en las variables maltodextrina y sacarosa en dos representaciones diferentes de la misma superficie de respuesta con una rotación de 180◦ entre sí. Los valores 1/0/+1 indican la concentración bajo/intermedio/alta los diferentes agentes empleados, respectivamente.

Se seleccionaron, entonces, dos combinaciones de maltosa, maltodextrina y sacarosa para probar en una extrusora de planta piloto industrial. Las condiciones de extrusión llevadas a cabo en la planta implicaron una exposición breve a 80°C y presiones más altas que las condiciones empleadas en experimentos a escala laboratorio. Aun así, en experimentos exploratorios que se realizaron en la misma planta se observó que la operación de extrusión tiene un impacto mínimo en la viabilidad de la levadura, siendo la operación de secado responsable de la disminución en los recuentos de levadura. Las formulaciones ensayadas incluyeron: maltosa 15%, maltodextrina 4% y sacarosa 30% p/v (Pellet 1), maltosa 5%, maltodextrina 5% y sacarosa 30% p/v (Pellet 2) y una tercer condición sin aditivos que se utilizó como control. Las formulaciones se prepararon

con una concentración inicial de $1,8x10^8$ UFC/g de levadura. Los extrusados se secaron en un túnel durante 150 min a 60 °C. Los recuentos microbianos y la humedad relativa alcanzada se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4: Levadura recuperada al pelletizar diferentes formulaciones en planta piloto. El recuento se realizó una semana después de granular las diferentes formulaciones

Formulación	Recuento levaduras inicial	Recuento levaduras pellet	% Humedad
Pellet 1	$2,4\pm0,8x10^8$	$1,0\pm0,1x10^3$	7,33
Pellet 2	$2,1\pm0,4x10^8$	$1,9\pm1,5x10^4$	7,83
Pellet s/aditivos	$3,1\pm1,6x10^8$	$5,5\pm 0,5x10^3$	8,11

La recuperación de levadura en el producto final obtenido fue, en general, menor en comparación a los resultados anteriores, posiblemente debido a la condición tiempo-temperatura más estricta de secado de este experimento. La combinación maltosa 5%, maltodextrina 5% y sacarosa 30% p/v utilizada en el pellet 2 mostró un efecto protector positivo, generando una concentración tres veces mayor de levaduras viables en comparación con la condición de control. A pesar de que la ecuación obtenida en el experimento de Box-Behnken predijo un resultado similar para las dos formulaciones probadas, quedó demostrado que el uso de niveles más altos de maltosa tiene un impacto negativo en la viabilidad (Tabla 3.4). Cabe destacar que, en cuanto al almacenamiento de los pellets a temperatura ambiente, el recuento de levaduras viables se mantuvo sin cambios significativos hasta 30 días después de su producción.

Figura 3.10: Aspecto macroscópico de pellet obtenido.

Además, se estudió la actividad antiinflamatoria de las colonias de levadura obtenidas a partir de pellets producidos en condiciones industriales en el sistema reportero de células intestinales Caco-2 ccl20:luc. Pudo observarse que todas las colonias analizadas mostraron capacidad para reducir la activación de las células Caco-2 inducida por FliC en un 40% (Figura 3.11, P <0,01). No hubo diferencias en la capacidad de inmunomodulación mostrada entre los pellets extruidos de *K. marxianus* CIDCA 9121 con y sin aditivos. Es importante señalar que esta capacidad se mantuvo también luego de almacenar los pellets durante 30 días a temperatura ambiente (datos no mostrados).

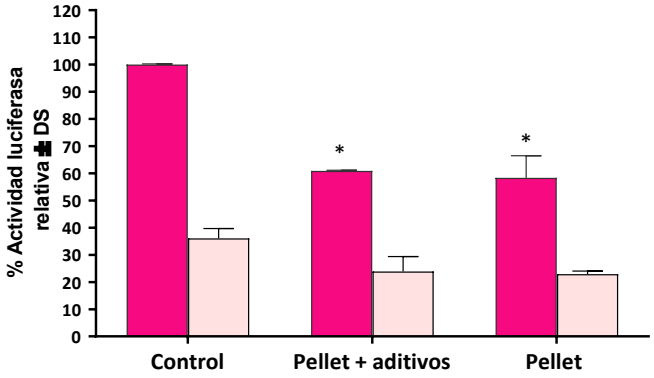


Figura 3.11: Porcentaje de activación de la expresión de luciferasa en células Caco-2 CCL20:luc estimuladas con flagelina previamente tratadas con suspensión de colonias de levadura CIDCA 9121 recuperada de pellet con la formulación 2 (pellet con aditivos) y pellet de formulación 3 (pellet sin aditivos). Células preincubadas con medio DMEM fueron utilizadas como control. Las barras (●)indican la condición basal y las barras (●) indican condición estimulada con FliC 1µg/ml. Se señalan las diferencias significativas (*p<0,01) respecto al control.

Estos estudios por primera vez mostraron que una levadura puede mantener su viabilidad y propiedades probióticas pospelletizado. Si bien la perdida de viabilidad es importante, aún quedan diferentes estrategias que pueden aplicarse para mejorar la productividad del proceso y que serán evaluadas en ensayos futuros.

Análisis de la obtención de *K. marxianus* CIDCA 9121 liofilizada

Desde hace décadas, la liofilización, es el método más conveniente y ampliamente utilizado para la eliminación de agua y mejorar la estabilidad de almacenamiento de los probióticos (Broeckx et al., 2016). Durante el proceso de secado, los microorganismos están expuestos a diversos factores de estrés causados principalmente por la congelación y la sublimación del hielo. La congelación puede contribuir a la perdida de viabilidad celular por dos mecanismos principales, por un lado, el daño mecánico producido por la formación de cristales de hielo, y por el otro, estrés hiperosmótico. El tamaño de los cristales de hielo está determinado por la velocidad y

temperatura de formación. Por lo general, se prefiere un congelado rápido que deriva en la formación de calibre más pequeño y por consiguiente menor daño celular. Sin embargo, una congelación rápida en medios acuosos implica una disminución brusca del agua libre y por consiguiente un estrés hiperosmótico. Luego, durante la etapa de sublimación, la eliminación del agua unida a las células conlleva a cambios en la estructura celular y daños en los sistemas enzimáticos (Broeckx et al., 2016; Kiepś & Dembczyński, 2022).

Se estudió la obtención de levadura liofilizada a partir de la biomasa de *K. marxianus* CIDCA 9121 resuspendida en diferentes concentraciones de permeado de lactosuero 10 y 20% p/V. Las diferentes suspensiones de levadura se sometieron al proceso de liofilización utilizando el equipo de laboratorio mostrado en Figura 3.3, A y se obtuvieron polvos con un recuento de levaduras viables 1,2 x10^5, 7,5 x10^6 y 8,4 x10^7 UFC/g cuando la concentración de permeado fue de 0, 10 y 20%, respectivamente (Figura 3.12).

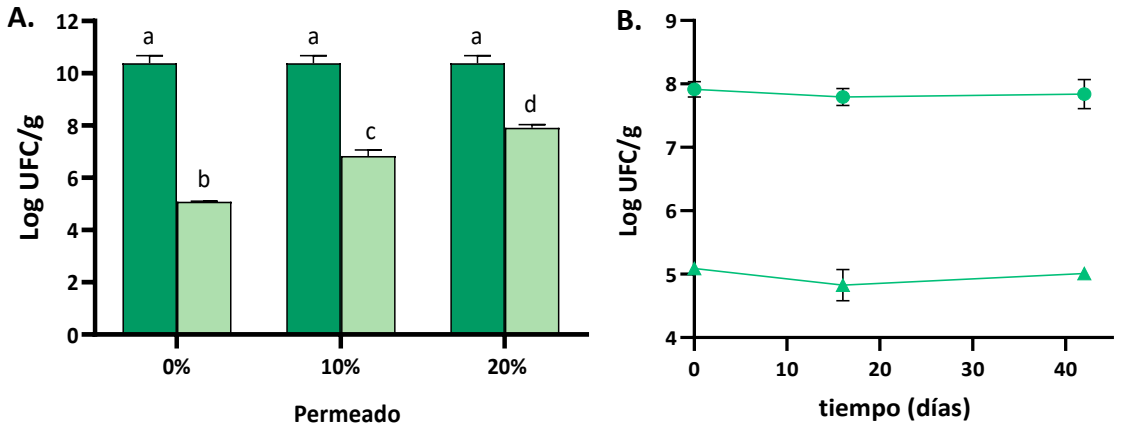


Figura 3.12: A. Recuento de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 viable antes (●) y luego de la liofilización (●) para suspensiones de levadura formuladas con diferente concentración de permeado de lactosuero. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) **B.** Evaluación de estabilidad de polvos liofilizados obtenidos con permeado de lactosuero al 20% (●) y sin permeado de lactosuero (Δ) durante el almacenamiento de 25°C.

Se estudio el almacenamiento a 25°C de los polvos obtenidos y se observó que las muestras fueron estables durante 40 días independientemente del agregado de permeado (Figura 3.12, B). Cabe destacar que el recuento de levaduras viables en el polvo obtenido empleando permeado al 20% fue de 4 x10^6 UFC/g luego de 75 días de almacenamiento a 25°C.

Selección de agentes lioprotectores

Se evaluó el uso de sacarosa, maltosa, maltodextrina y lactosuero como agentes lioprotectores. (Figura 3.13).

Figura 3.13: Aspecto *K. marxianus* CIDCA 9121 liofilizada empleando diferentes lioprotectores. De izquierda a derecha: control, sacarosa, maltosa, maltodextrina y suero.

Las formulaciones con maltosa, maltodextrina y suero lograron disminuir significativamente la pérdida de viabilidad respecto a la formulación control sin lioprotector (Figura 3.14 A). La concentración de levadura viable en los liofilizados fue de 9,75 $x10^7$ UFC/g para la formulación control (sin aditivos), 2,37 $x10^8$ UFC/g para formulación con sacarosa, 4,27 $x10^9$ UFC/g para formulación con maltosa, 3,3 $x10^8$ UFC/g en el caso de adición de maltodextrina y 2,23 $x10^9$ UFC/g para el liofilizado con lactosuero como aditivo. Estos resultados son comparables a los obtenidos por otros autores tales como Guowei et al. (2019), con polvos liofilizados de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* de 9,5 $x10^9$ UFC/g utilizando lactosa, trehalosa y alginato de sodio como crioprotectores. Arslan et al. (2015), obtuvo polvos liofilizados del mismo microorganismo con recuentos de 7,4 $x10^8$ UFC/g y 4,1 $x10^8$ UFC/g mediante la encapsulación de la levadura con proteínas de suero al 20%p/v o maltodextrina al 20% p/V, respectivamente.

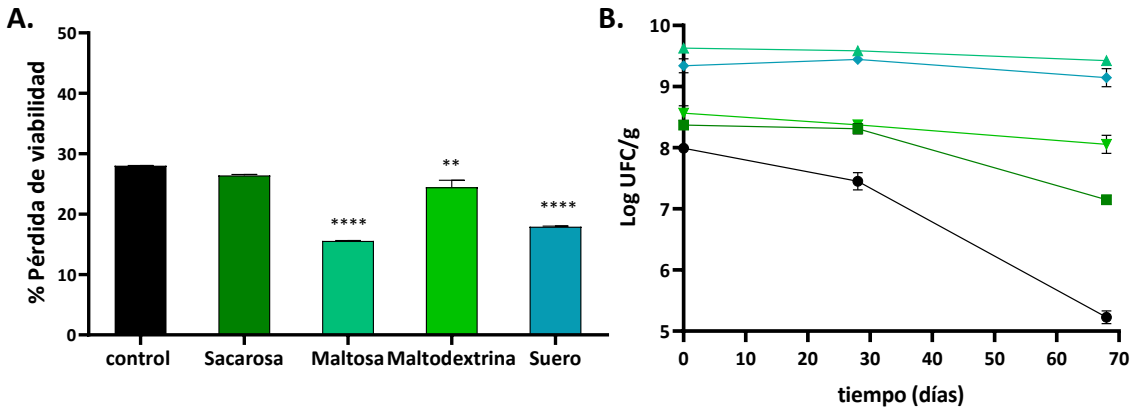


Figura 3.14: A. Perdida porcentual de viabilidad de la levadura CIDCA 9121 en los liofilizados. Se muestran las diferencias significativas respecto al control ** p<0,001, **** p<0,0001. **B**. Recuentos de levaduras en los liofilizados obtenidos en función del tiempo de almacenamiento a 25°C. Se muestran los resultados obtenidos para liofilizados obtenidos con formulaciones sin aditivos o control (●), con sacarosa (●), maltosa (●), maltodextrina (●) o suero (●).

Cuando se evaluó la estabilidad de los liofilizados obtenidos almacenados durante 68 días a temperatura ambiente, se evidenció que la adición de los diferentes agentes lioprotectores mejoraron la supervivencia de la levadura en el producto final durante el almacenamiento respecto al liofilizado obtenido sin aditivos y en particular, la formulación con maltosa o suero fueron las más estables en el tiempo con un descenso logarítmico de tan solo 0,2, mientras que para el control fue de 2,7 logaritmos (Figura 3.14 B). Recientemente, Fredua-Agyeman (2024) evaluó la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* LA-5® liofilizado y observó que la adición de leche descremada protege al probiótico durante el almacenamiento a 25°C mejor que la trehalosa y el glicerol 15%, aunque al cabo de 60 días a dicha temperatura la viabilidad desciende aproximadamente 3 logaritmos. Si bien debe tenerse en cuenta que la sobrevida a los diferentes procesos de conservación es una propiedad inherente a cada especie, este resultado pone en evidencia la gran resistencia de la levadura estudiada a la liofilización, constituyendo una ventaja para su posible comercialización como microorganismo probiótico.

Para concluir este análisis se determinó la funcionalidad biológica de todos los liofilizados obtenidos y se observó que conservaron la actividad inmunomoduladora de la respuesta inflamatoria a nivel intestinal, reduciendo significativamente la actividad luciferasa en células Caco-2 (ccl20:luc) estimuladas con flagelina cuando estas fueron preincubada con una suspensión 1/100 de los liofilizados obtenidos. Cabe destacar que el porcentaje de modulación de la respuesta inflamatoria alcanzó valores del 79-88% comparables con los observados para la

biomasa de levadura húmeda. La inclusión de fosas de células preincubadas con suspensión de liofilizados tratados térmicamente (100°C durante 1hora) nos permitió poner en evidencia que la sacarosa, maltosa, maltodextrina o suero presentes en los liofilizados no poseen capacidad inmunomoduladora por si solos, sino que se requiere estrictamente la presencia de la levadura viable para ejercer este efecto (Figura 3.15).

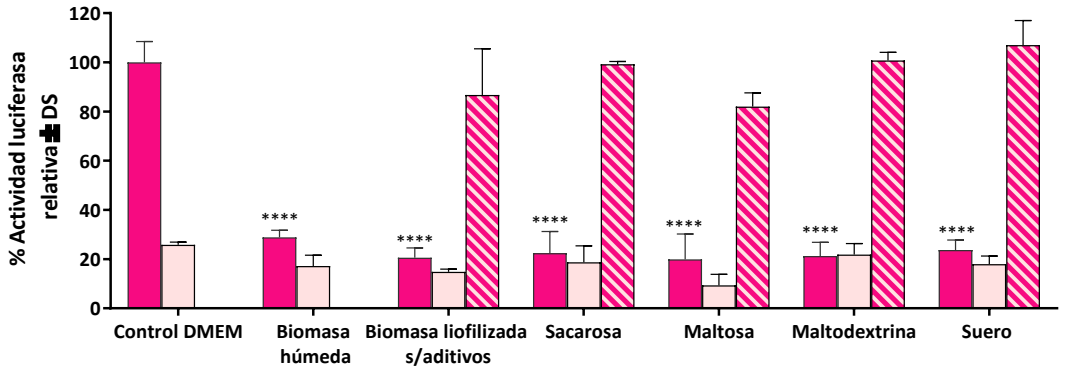


Figura 3.15: Porcentaje de activación de la expresión de luciferasa en células Caco-2 CCL20:luc estimuladas con flagelina (●) previamente tratadas con: suspensión de liofilizados de CIDCA 9121 obtenidos con sacarosa, maltosa, maltodextrina y suero como aditivos, liofilizado sin aditivos y biomasa húmeda CIDCA 9121. Barras rayadas indican células preincubadas con los liofilizados tratados térmicamente y luego estimuladas con Flic 1µg/ml. Barras (●) indican condición sin estimulo proinflamatorio. Se informan los resultados de dos ensayos independientes. Diferencias significativas (****p<0,0001) respecto al control.

Liofilización en planta piloto

El proceso de liofilización a escala piloto se llevó a cabo empleando el liofilizador L-I-E260-CR RIFICOR que se muestra en la figura 3.3,B. La temperatura inicial del condensador de -35°C, presión de vacío de 16 Pa y una temperatura de estante de 25°C temperatura ambiente. Bajo estas condiciones se obtuvo un producto final con un recuento de *K. marxianus* CIDCA 9121 de $5{,}5x10^9$ UFC/g, partiendo de una formulación de biomasa de levadura resuspendida al 50% p/v en una solución de suero de quesería al 20% p/v. Se liofilizó un total de 2,5 kg de biomasa húmeda y se obtuvieron alrededor de 1,5 Kg de polvo deshidratado. El producto obtenido presentó aspecto comparable con levadura comercial (Figura 3.16) buenas cualidades de disolución en agua y no presentó desarrollo de microorganismos mesófilos contaminantes en agar nutritivo al cabo de 48 h de incubación a 30°C.

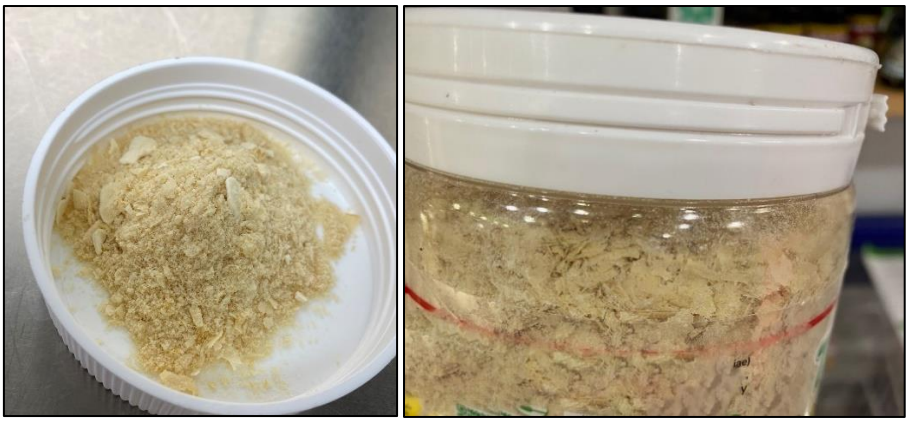


Figura 3.16: Comparación del aspecto macroscópico entre liofilizados de levadura *K.marxianus* CIDCA 9121 obtenida en este estudio (izquierda) y levadura comercial (derecha).

Finalmente se determinó que *K. marxianus* CIDCA 9121 liofilizada bajo estas condiciones y utilizando suero como lioprotector conservó la capacidad inmunomoduladora de la respuesta inmune innata intestinal en células Caco-2 (ccl20:luc). Tal como se observa habitualmente para la levadura fresca, el descenso en la actividad luciferasa de células reporteras depende de la cantidad de levaduras viables usadas en el ensayo, observándose un efecto dosis respuesta. (Figura 3.17).

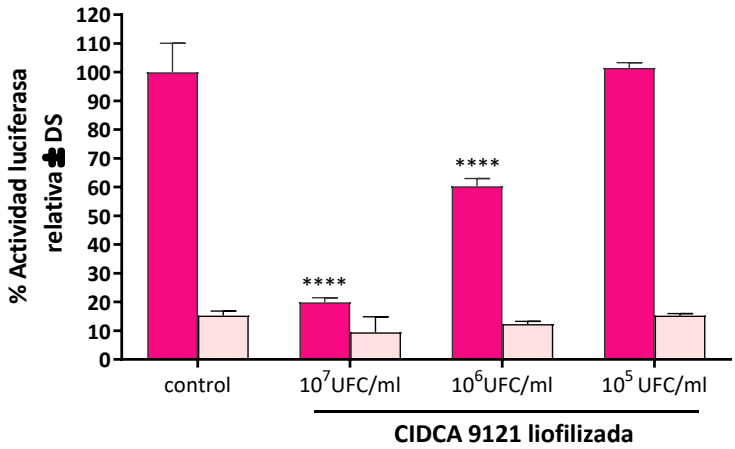


Figura 3.17: Porcentaje de activación de la expresión de luciferasa en células Caco-2 CCL20:luc estimuladas con flagelina (●) previamente tratadas con una suspensión de liofilizado de CIDCA 9121 obtenido utilizando suero como lioprotector. Se ensayaron diferentes diluciones 1/10 en DMEM (10^{-2},10^{-3}y 10^{-4}). Barras (●) indican condición sin estimulo proinflamatorio. Diferencias significativas (****p<0,0001) respecto al control.

A lo largo de este capítulo se han explorado diferentes tecnologías ampliamente utilizadas en la conservación de microorganismos probióticos. Dos lineamientos principales guiaron la selección

de un proceso que permita el almacenamiento de biomasa de *K. marxianus* CIDCA 9121 en cantidades industriales, por un lado, la conservación en la viabilidad en el producto final en concentraciones que sean competentes con los que se encuentra actualmente en el mercado, teniendo en cuenta que las dosis de administración de una levadura probiótica deben ser de alrededor de entre $5x10^8$ y $1x10^{10}$ UFC/g de producto (*K.marxianus* B0399, Turval Laboratories https://turval.com/en/products-and-distribution/turval-b0399-500; Levucell SB20 y Levucell ME TITAN, Lallemand https://www.lallemandanimalnutrition.com/es/south-america/productos/levucell-sb y Actisaf 47, Lessafre https://phileo-lesaffre.com/en/improve-survival-of-young-piglets-and-increase-weaning-weights-with-live-yeast-probiotic/). Por otro lado, el mantenimiento de la capacidad de regular la respuesta inmune inflamatoria a nivel intestinal, monitoreada con un sistema reportero de células Caco-2 (ccl20: luc), garantizando que el producto final conserve las características probióticas de la levadura fresca.

Si bien la biomasa de levadura húmeda es capaz de ser conservada a 4°C durante 3 meses sin mostrar modificaciones importantes en la viabilidad celular y tampoco en la actividad inmunomoduladora a nivel intestinal, sabemos que esta metodología es costosa a la hora de pensar en una producción a gran escala o bien, pensando un producto que va a tener costos más altos de traslado en comparación a un producto deshidratado que pueda mantenerse a temperatura ambiente. Es por esto, que se evaluaron diferentes metodologías que nos permitieron obtener productos secos pero que implicaron diferentes situaciones de estrés para la levadura tratada. En todos los casos se logró obtener un producto con diferentes concentraciones de levadura final en un rango de $1x10^4$ – $5,5x10^9$ UFC/g, con mantenimiento de la capacidad probiótica.

Diferentes compuestos han sido incorporados como aditivos en la formulación en función de mitigar el estrés osmótico y térmico al que se ve expuesta la levadura durante los procesos de deshidratación. Como resultado, hemos evidenciado que la inclusión de permeado de suero en la formulación sometida a un proceso de secado spray mejoró no solo el recuento de levadura en el producto final sino también su estabilidad durante el almacenamiento a 25°C durante más de un mes. Por su parte, la utilización de una combinación de sacarosa, maltosa y maltodextrina mejoraron la recuperación de levaduras viables en un producto extrusado y secado a 60°C a escala industrial. La maltosa, maltodextrina y el lactosuero mostraron ser buenos candidatos como agentes lioprotectores; formulaciones conteniendo estos compuestos mejoraron significativamente la viabilidad de le levadura en los liofilizados, obteniendo un producto deshidratado con las concentraciones más elevadas de levadura CIDCA 9121 en comparación a las otras tecnologías estudiadas.

En particular, la utilización de lactosuero en las formulaciones de levadura a liofilizar en escala industrial aportó evidencias contundentes de su actividad lioprotectora, presentándolo como una alternativa atractiva desde el punto de vista económico para la obtención de un producto probiótico deshidratado a base de levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121.

CONCLUSIONES

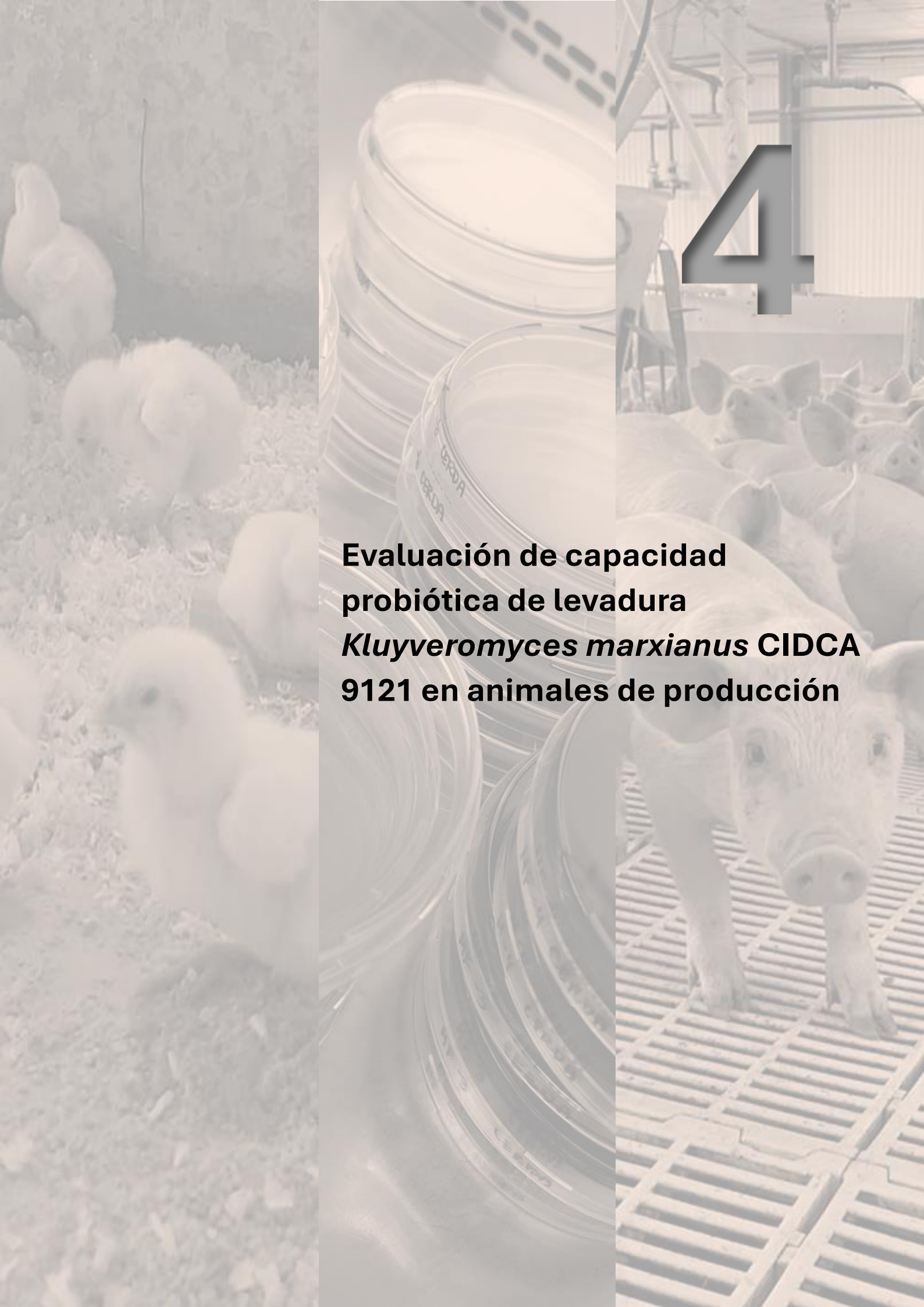
- ✓ La biomasa húmeda de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 obtenida por cultivo en permeado de lactosuero sobrevive el almacenamiento a 4°C por un período mayor a 3 meses manteniendo un recuento de 3,8 x10^9 UFC/g.

- ✓ El tratamiento de deshidratación por secado spray afecta drásticamente la viabilidad de la levadura *K. marxianus* CIDCA 9121. La adición de permeado de lactosuero 20% p/v a la formulación mejoró significativamente la sobrevida de la levadura, obteniéndose un producto deshidratado con 10^7 UFC/g . El uso de permeado de lactosuero mejoró además la estabilidad de la levadura almacenada durante 42 días a temperatura ambiente.

- ✓ La aplicación de un diseño estadístico de Placket Burmann y Box-Behnken permitió la selección de sacarosa, maltosa y maltodextrina como agentes termoprotectores en la formulación de un producto extrusado conteniendo 1,9 x10^4 UFC/g levaduras viables y actividad modulatoria de la respuesta inmune innata intestinal in vitro al final del proceso.

- ✓ Se evidenció un efecto lioprotector de maltosa, maltodextrina y lactosuero en la obtención de productos liofilizados con un máximo de 4,27 x10^9 UFC/g para formulación con maltosa y 2,23 x10^9 UFC/g para el liofilizado con lactosuero.

- ✓ El proceso de liofilización llevado a cabo a escala piloto empleando lactosuero como lioprotector permitió obtener 1,5 Kg de levadura deshidratada con una concentración de viables de 5,5 x10^9 UFC/g y actividad probiótica.



4

Evaluación de capacidad probiótica de levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 en animales de producción

INTRODUCCIÓN

Las industrias de producción porcina y avícola siguen creciendo en muchas partes del mundo debido fundamentalmente al poderoso impulso del crecimiento demográfico y los procesos de urbanización. La industria porcina se presenta como el principal transformador de proteína vegetal en animal, donde el mayor productor es China, con el 51% de participación seguido por la Unión Europea (20%) y los Estados Unidos (10%), produciendo anualmente a razón de 111 millones de toneladas. Por su parte, Argentina produce cerca del 6% de la producción global (unas 6,5 millones de toneladas) y los datos oficiales dan cuenta de un consumo de 12,5 Kg de carne de cerdo por persona anualmente (Anuario Porcino, 2021). Respecto a la industria avícola, los Estados Unidos de América son el mayor productor mundial con el 17% de la producción mundial, seguido de China y Brasil. Para atender la creciente demanda, la producción mundial de carne avícola se incrementó de 9 a 133 millones de toneladas entre 1961 y 2020. Según lo indica el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) dependiente de la Secretaria de Bioeconomía y del Ministerio de Economía de la Nación, existe en Argentina una población promedio de 139 millones de aves industriales, de las cuales un 71,3% corresponde a pollos de engorde. El consumo per cápita ha ido creciendo en las últimas décadas hasta 46 kg/habitante/año, registrándose aumentos constantes en volúmenes de producción y niveles de consumo, siendo la fuente de proteína animal de menor costo (https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/cadenaanimal/aves).

En los últimos años se han generado mejoras en la productividad de animales especialmente por el aumento en la velocidad de ganancia de peso durante crecimiento gracias a la combinación de prácticas de selección genética y esquemas de nutrición en las distintas etapas de desarrollo. Dentro de la **industria porcina**, la producción de lechones sanos es un reto y requiere un programa nutricional adecuado, tanto para la cerda como para los lechones. Dado que la cerda tiene una gran influencia en la calidad de los lechones al nacimiento, así como en el destete, es fundamental proporcionarle el conjunto adecuado de nutrientes para favorecer el crecimiento fetal y la producción de calostro de calidad y cantidad de leche (Viggo et al., 2001). El nacimiento y el destete de los lechones conllevan modificaciones importantes a nivel intestinal. Al momento del nacimiento, su tubo digestivo es estéril en condiciones no patológicas. Unas horas post nacimiento, ya se encuentran bacterias procedentes de la propia cerda, de sus heces, del canal de parto o bien del ambiente. Estos microorganismos compiten e interactúan entre sí, constituyendo una comunidad estable y compleja. El destete es un período muy desafiante y estresante en la vida de los lechones debido al cambio en la forma de alimentación de líquido a

sólido, cambiando a un nuevo entorno de vida y contacto con otros lechones, lo que provoca cambios drásticos en la microbiota intestinal, especialmente dentro de las dos primeras semanas después del destete. Durante la etapa de lactante, las vellosidades del intestino delgado aumentan su longitud, mejorando la capacidad absortiva del intestino. Al momento del destete, los factores de stress mencionados y el cambio en la composición de la dieta, marcado principalmente por la presencia de cereales, causan una atrofia transitoria de las vellosidades, reduciendo de manera directa la absorción intestinal. Estos cambios ocurren principalmente entre los primeros 2-14 días post-destete, que se corresponde al momento de aparición de diarreas y caída de la ganancia diaria de peso durante la etapa de recría. La baja producción de ácido clorhídrico estomacal en estas primeras semanas conlleva a una incorrecta activacion pepsinógeno en pepsina y las proteínas no puedan ser digeridas, pasando directamente al intestino donde comenzarán a fermentarse, además, las enzimas encargadas de degradar los componentes del alimento balanceado se encuentran en estado inmaduro antes de las tres semanas de vida complicando la degradación de las proteínas, como así también las fuentes de grasas de origen animal y vegetal. Los nutrientes no digeridos y no absorbidos presentes en la luz intestinal sirven de sustrato para las bacterias enteropatógenas, propiciando su proliferación y conduciendo al animal a cuadros diarreicos (De Souza et al., 2012). Estas tensiones pueden originar diarreas y retraso en el crecimiento de los lechones, que afecta la eficiencia de producción de los cerdos y resulta en graves pérdidas económicas (Wang et al., 2023).

En la **produccion avícola** de pollos de engorde, los pollos parrilleros son de los animales que exhiben mayor tasa de conversión de alimento en masa muscular, lo cual fue logrado a partir de selección genética y diseño de estrategias de alimentación en etapas. La alimentación de los pollos comprende diferentes etapas: Pre-inicio: 0-7 días; Inicio: 8-14 días; Crecimiento: 15-22 días y Engorde >23 días. La primera semana de vida es crítica para el desempeño del sistema digestivo del animal. En el pollo recién nacido, la transformación de la absorción embrionaria de la yema a la utilización del alimento se ve acompañada de cambios dramáticos en el tracto digestivo. La altura de las vellosidades intestinales y la profundidad de las criptas se incrementan rápidamente tras la eclosión, alcanzando un máximo a los cuatro – seis días en duodeno y a los diez días en yeyuno e ileón. Es por ello que se incrementa la superficie de absorción, aumentando así la capacidad de absorción de nutrientes, además de la puesta en marcha de sistemas activos de transporte a través de la membrana. El aparato digestivo de los pollos jóvenes es inmaduro, por lo que se deben asegurarse niveles óptimos de nutrientes y el empleo de materias primas de buena calidad (Yerpes et al., 2020; Wickramasuriya et al., 2022). Además de los problemas derivados del inicio de alimentación a las pocas horas de nacimiento y el

desarrollo rápido al que se somete su tracto digestivo, los pollos de engorde enfrentan otros desafíos como es el estrés térmico. Este deriva principalmente de la falta de glándulas sudoríparas lo que impide una regulación correcta de la temperatura corporal agravado por el aumento de temperatura global del planeta debida al cambio climático, el hacinamiento y las dietas altamente calóricas que se administran (Brugaletta et al., 2022; Teyssier et al., 2022). Todos estos factores pueden comprometer la salud intestinal de los pollos, y consecuentemente la digestión y la absorción de nutrientes, la conversión alimenticia, ganancia de peso y mayor susceptibilidad a enfermedades (Cardoso Dal Pont et al., 2022). Un animal con deterioro en la salud intestinal es más propenso a las infecciones por protozoarios, bacterias y virus que pueden tener distinta severidad y son prevenidas con buenas prácticas productivas. Aun así, estas amenazas generan importantes pérdidas económicas. Las infecciones por *Clostridium perfringes* son relativamente comunes pudiendo variar en gravedad de acuerdo con distintos factores, entre ellos los factores de virulencia, entre ellos varias toxinas, que exprese el patógeno (Fathima et al., 2022).

Un elemento que forma parte habitual en el manejo de los animales de producción es el empleo de antibióticos en forma preventiva para evitar infecciones gastrointestinales frecuentes resultando en muchos casos en una mejora en la tasa de conversión de alimento a carne/kg vivo, lo cual, si bien resulta efectivo, es una práctica que tiende a ser reemplazada debido al enorme impacto que genera en la aparición de resistencia a los antimicrobianos lo que constituye una amenaza para la salud humana y animal (Alonso et al., 2024). Si bien se espera que hasta el 2030 continúe en aumento el consumo de antibióticos debido a estas prácticas, desde hace unos años está ocurriendo un cambio en el marco regulatorio tendiente a restringir su uso en producción animal (Kober et al, 2022). En la Unión Europea y Japón el uso de antibióticos como promotores del crecimiento animal está prohibido desde hace años y se espera que en forma inminente esta misma restricción comience a aplicarse en Estados Unidos y en China. Desde enero de 2022, la Unión Europea puso en vigencia una reglamentación que prohíbe la importación de productos animales que hayan sido generados usando antibióticos en forma preventiva. A su vez se está evaluando eliminar en Europa el uso de otros compuestos como Zn y Cu, en dietas para lechones de recría, también utilizados como promotores de crecimiento, por su contaminación al ambiente (Satessa et al., 2020). En general esta tendencia mundial marcará una necesidad de adaptación para los distintos sistemas productivos, lo cual debe ser seguido con especial interés en nuestro país. En Argentina, desde 2019 se prohibió el uso de Colistina en todo tipo de alimento para animales. El SENASA, trabaja en un plan para seguir la tendencia europea suprimiendo el uso de Cefalosporinas de 3ra generación y Quinolonas. En el 2022 se promulgó

la Ley 27.680 de Prevención y Control de la Resistencia Antimicrobiana que tiene como objetivo velar por el uso responsable de los antibióticos y regular cuestiones referidas al expendio y uso de estos medicamentos, tanto en salud humana como en sanidad animal.

Considerando estas tendencias globales, el uso de probióticos aparece como una alternativa interesante en la promoción y desarrollo de animales de producción. Se ha observado que la suplementación alimentaria con probióticos mejora el rendimiento de crecimiento en animales de producción a través de diferentes mecanismos que conducen a mejoras significativas en la salud, inmunidad, crecimiento, función digestiva y equilibrio microbiano intestinal. Entre los probióticos más utilizados hoy en día en cerdos y pollos de engorde se encuentran como principales especies *Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus, Bacillus y Saccharomyces* (Gaggia et al, 2010; Satessa et al., 2020; Kober et al., 2022; Al-Otaibi et al., 2023).

Los agentes promotores del crecimiento, como los probióticos, pueden alterar el entorno microbiano intestinal, afectando así el metabolismo de los lípidos y, a su vez, la calidad del animal. Los probióticos pueden modular la microbiota del rumen o del intestino posterior, alterar el patrón de fermentación y aumentar el flujo de nutrientes al intestino delgado, mejorando así la naturaleza digerible de la dieta. Se producen, comercializan y utilizan diversos tipos de productos a base de levadura en la formulación de alimentos para animales. Los resultados de investigaciones publicadas han indicado que su utilización sirve como potenciador natural del crecimiento animal y, posee además capacidad para mejorar la digestibilidad de los nutrientes, el equilibrio del microbioma intestinal, la estructura intestinal, la salud general y los atributos productivos y reproductivos en cerdos y aves de corral (Zhu et al.,2021; Pang et al., 2022; Samphat et al., 2023; Alyi et al., 2023). Los efectos positivos de los productos de levadura pueden atribuirse a su potencial para prevenir el establecimiento de patógenos en el tracto gastrointestinal, ajustar la composición de la microbiota intestinal, influir en el sistema inmunológico y potencialmente participar en actividades antioxidantes y antimutagénicas (Samphat et al., 2023). Es por esto que en el presente trabajo de Tesis se propuso evaluar la suplementación con levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 crecida en permeado de lactosuero que demostró poseer propiedades probióticas en el laboratorio, en dos sistemas animales monogástricos que enfrentan diferentes desafíos en la producción como son los cerdos y pollos parrilleros.

OBJETIVOS

Considerando que la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 crecida en permeado de suero presenta diferentes características probióticas *in vitro* e *in vivo* en animales de laboratorio se procedió a evaluar el efecto benéfico en animales de producción avícola y porcina con el fin de evitar la aparición de trastornos gastrointestinales durante la transición de dieta/destete, minimizar el uso de antibióticos como promotores de crecimiento y eventualmente optimizar los parámetros productivos.

Objetivos específicos

- Estudiar la utilización de levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 crecida en permeado de lactosuero en la alimentación de animales de producción: forma de administración, palatabilidad, inocuidad y resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal.
- Analizar el efecto de la suplementación dietaria con *K. marxianus* CIDCA 9121 viable liofilizada sobre los parámetros productivos y metabólicos de cerdas gestantes y lechones en granja.
- Evaluar el impacto en la conversión de biomasa y parámetros de ecología intestinal en la cría de pollos parrilleros suplementados con *K. marxianus* CIDCA 9121.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Estudio preliminar sobre la suplementación con la cepa Kluyveromyces marxianus CIDCA 9121 a cerdas gestantes y sus lechones: forma de administración, palatabilidad, inocuidad y resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal

El ensayo se llevó a cabo con un número reducido de animales, trabajando con cerdas gestantes híbridas Landrace x Yorkshire que se encontraban entre su segundo y sexto parto. A una cerda gestante se le administraron diariamente 10^9 levaduras viables por Kg de alimento balanceado durante 20 días previos al parto a fin de determinar el grado de aceptación, y otra cerda gestante fue empleada como control sin suplementación dietaria. La suplementación con levadura se mantuvo durante la lactancia. Los lechones destetados a los 28 días, provenientes de la cerda suplementada, (n=11) recibieron una dosis de levadura fresca de 10^9 UFC/día/lechón durante 19 días. Como control se incluyó una camada (n=11) que recibió alimento balanceado sin contener levaduras viables. Todos los animales recibieron alimento balanceado formulado en base a los requerimientos nutricionales. Se analizaron parámetros productivos y de salud: peso de los lechones al nacimiento, al destete y al momento de la faena (19 días posdestete). Se registraron además scores de diarrea. Se realizaron análisis microbiológicos en heces de lechones recolectadas al destete, a los 8 y 12 días postdestete. Para ello, las heces se homogeneizaron por grupo, se prepararon diluciones en solución fisiológica estéril y se sembraron en medios: YGC, YPLC, agar nutritivo, MRS y McConkey (Figura 4.1).

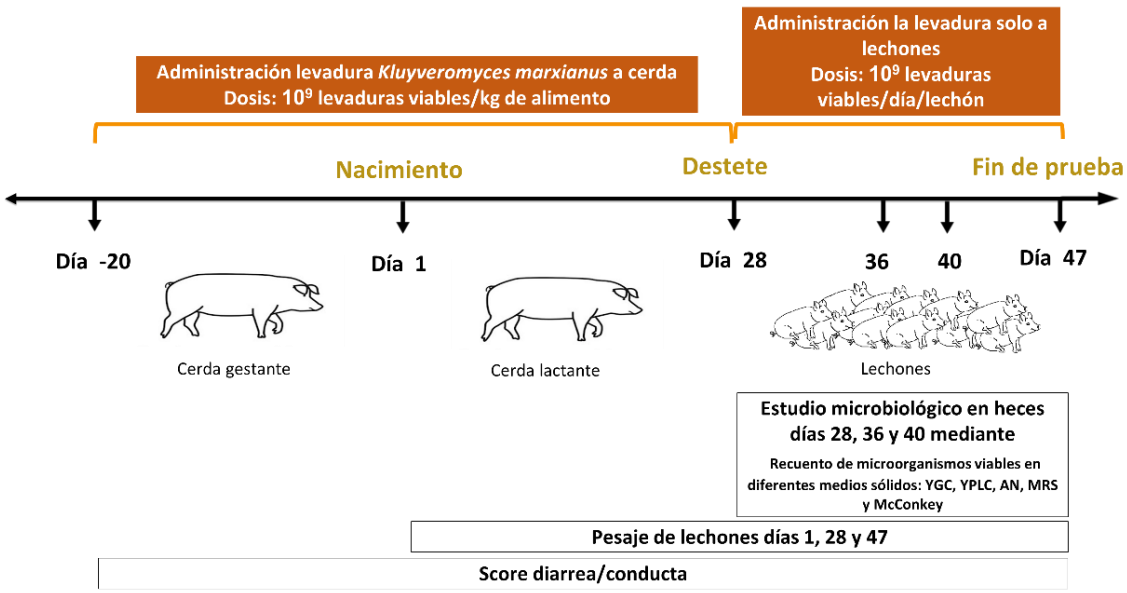


Figura 4.1: Esquema de ensayo de suplementación con la cepa *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 a cerdas gestantes y sus lechones

4.2. *Estudio de la suplementación con la cepa Kluyveromyces marxianus CIDCA 9121 liofilizada a cerdas gestantes, en lactancia y primera alimentación a lechones en granja productiva*

Para llevar a cabo este experimento se trabajó en asociatividad con la Granja de producción "4B" de la provincia de Buenos Aires. El diseño experimental puede visualizarse en detalle en la Figura 4.2.

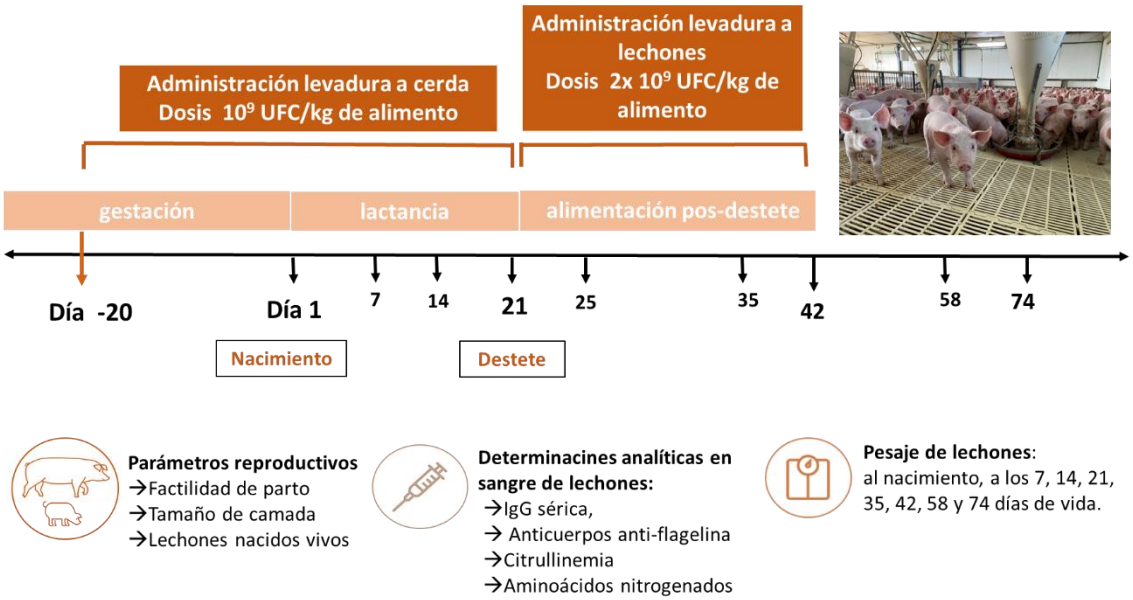


Figura 4.2: Esquema del ensayo de suplementación con la cepa *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 liofilizada a cerdas gestantes y sus lechones en ensayo en granja.

Se conformaron dos grupos experimentales con 8 cerdas de raza TN70 de 115-111 días de gestación. Un grupo de 8 cerdas recibió suplementación dietaria con levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 liofilizada 5,5 x10^9 UFC/g en una dosis de 1,4 g de liofilizado/día/cerda *on top* sobre el alimento balanceado. La suplementación se realizó durante los últimos 20 días de gestación y los 21 días de lactancia de los lechones. Una vez destetados, los lechones de la progenie de cerdas suplementadas recibieron una dosis diaria de aproximada de 1x10^9 UFC/día. En este caso la dosis de levadura fue distribuida *on top* sobre una porción reducida de alimento balanceado dispuesto en tolvas plásticas de recría. Todos los animales recibieron una dieta basal de alimento balanceado formulado según los requerimientos de la raza comúnmente utilizado en la granja y agua *ad libitum*. El día del nacimiento de los lechones se registró la duración de parto por camada, el intervalo de expulsión entre lechones, el tamaño de camada, así como el número de lechones nacidos vivos para las cerdas de ambos grupos experimentales. Además, se tomó una muestra de calostro para la determinación de IgA. Los lechones fueron pesados al nacimiento y se siguió la evolución de los pesos individualmente a los 7, 14 días (fase de lactancia), a los 21

días (destete), a los 35 y 42 días (fase de suplementación con levadura en recría) y en los días posteriores al cese de suplementación con levadura (Figura 4.2). Se tomaron muestras de sangre a los 19 y 25 días de 5 lechones por grupo para la determinación de anticuerpos anti-flagelina, dosaje de IgG sérica y niveles de aminoácidos nitrogenados: ornitina, glutamina, arginina, prolina y ácido glutámico.

4.2.1 Determinación de IgA calostral

La determinación se realizó empleando el kit CSB-E12063p Pig secretory immunoglobulin A (SIgA ELISA Kit de CUSABIO, Huston, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente el sistema es un ELISA de captura que emplea un par de anticuerpos específicos para los analitos a determinar, uno de los cuales está conjugado a un sistema enzimático de detección que permite el revelado por una reacción colorimétrica. Se realizó una curva de calibración entre 150 ng/mL y 37,5 ug/mL de IgA provisata por el frabicante. Se trabajó con un volumen de 100 uL por fosa empleando PBS-Tween 20 0,05% como el diluyente y 1% de proteína de leche como bloqueante para evitar adsorción inespecífica. Las muestras se incubaron a la dilución deseada (usualmente 1:100 de la muestra de calostro) durante 1h a 37ºC. Luego de lavados con PBS Tween 0,05% se incubaron el anti-IgA conjugado con peroxidasa a la dilución indicada durante 1 h 37 ºC. Se realizaron 5 lavados, y luego se reveló por incubación durante 20 minutos con solución de 3,3’,5,5’-tetrametilbencidina (TMB), la cual es oxidada por acción de la peroxidasa. La reacción se detuvo agregando 40 uL de ácido sulfurico 2M y se leyó la absorbancia a 450 nm en equipo Varioskan Lux (Thermo Scientific, USA).

4.2.2 Determinación de IgG sérica en lechones

La determinación se realizó empleando el kit CSB-E06804p Pig Immunoglobulin G (IgG ELISA Kit de CUSABIO, Huston, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. El formato del ensayo es un ELISA de captura, que emplea dos anticuerpos específicos para los analitos a determinar, uno de los cuales está conjugado a un sistema enzimático de detección que permite el revelado por una reacción colorimétrica. Se realizó una curva de calibración entre 580 ng/mL y 150 ug/mL de IgG con el kit que provee el fabricante. Se trabajó con un volumen de 100 uL por fosa empleando el diluyente de PBS Tween 20 0,05% y 1% de proteína de leche como bloqueante para evitar adsorción inespecífica. Las muestras se incubaron a la dilución deseada (usualmente 1:50 de la muestra de suero) 1h a 37ºC. Luego, se lavó con PBS Tween 0,05% y se incubó con el anti-IgG conjugado con peroxidasa durante 1 h 37 ºC. Al cabo de una hora se lavó al menos 5 veces y el ensayo se reveló por incubación con solución de TMB durante 20 minutos. La reacción se detuvo

agregando 40 uL de ácido sulfúrico 2M y se leyó la absorbancia a 450 nm en equipo Varioskan Lux (Thermo Scientific, USA).

4.2.3 Determinación de anticuerpo anti-flagelina de Salmonella sp

La determinación se realizó empleando un sistema de ELISA indirecto optimizado para evaluar la respuesta específica de anticuerpos generada por la vacunación en granja. Las microplacas de ELISA (NUNC, Maxisorp, USA) se sensibilizaron con una suspensión de flagelina de *Salmonella* sp. purificada según fuera descripto previamente (Hiriart et al. 2013). Se empleó una suspensión 1 ug/mL preparada por disolución del stock de flagelina en buffer fosfato pH 7,4 durante toda la noche a 4°C. Luego las placas fueron lavadas con T-PBS (Buffer fosfato adicionado con Tween 20 0.05%) y posteriormente bloqueadas con suspensión de proteínas de leche al 3% en PBS, durante 1 hora a 37°C. Posteriormente fueron lavadas con T-PBS e incubadas con dilución 1:50 de los sueros porcinos a evaluar diluidos en T-PBS adicionado con proteínas de leche al 1%. Luego de lavados con T-PBS se incubó el anti-IgG conjugado con peroxidasa (CUSABIO, USA) a la dilución indicada durante 1 h 37 ºC. Luego de al menos 5 lavados, el ensayo se reveló por incubación durante 20 minutos con solución de o-phenilendiamina (OPD) y agua oxigenada 0,1 % preparada en el momento. La OPD es oxidada por acción de la peroxidasa generando un cambio en su absorbancia. La reacción se detuvo por agregado de 40 uL de ácido sulfúrico 2M y se lee absorbancia a 492 nm. Para las lecturas se empleó un equipo Varioskan Lux (Thermo Scientific, USA).

4.2.4 Determinación de Citrulina sérica y aminoácidos nitrogenados en sangre de lechones.

Estas determinaciones fuero realizadas en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA), Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. El análisis de las concentraciones de citrulina, prolina, arginina, glutamina, ornitina y acido glutámico en sobrenadantes de sueros de cerdos se realizó por HPLC/DAD con Cromatógrafo de líquidos Agilent HP1290 (bomba binaria, desgasificador, termostatizador de columna, inyector automático y detector DAD), previa derivatización con dinitrofluorobenceno (reactivo de Sanger). Las muestras fueron desproteinizadas con ácido tricloroacético al 30% p/v, centrifugadas a 10000 rpm (5 min) y derivatizadas. Un volumen de 50 µL sobrenadante se mezcló con 50 µL buffer borato/bórico 50mM pH 9.20, 30 µL de solución de reactivo de Sanger en acetonitrilo y 170 µL de acetonitrilo. Se mantuvieron a 45 ºC durante 45 min, y luego se detuvo la reacción con HCl 0.5M. Los derivatizados se centrifugaron nuevamente y luego se filtraron e inyectaron en cromatógrafo. Se utilizaron como estándares de amoácidos mezclas de seis aminoácidos de interés previamente derivatizados en tres niveles de concentración.

4.3. Estudio de la suplementación temprana con la cepa Kluyveromyces marxianus CIDCA 9121 a pollos parrilleros

Este ensayo fue llevado a cabo en las instalaciones la Sección Avicultura de la Estación Experimental Agropecuaria INTA-EEA Pergamino, Buenos Aires. Se emplearon 180 pollitos SS machos de la línea Cobb-500 de un día de vida distribuidos en 3 tratamientos con 3 corrales de 20 pollos cada uno en un diseño en bloques completos al azar donde cada lote fue considerado la unidad experimental. El grupo de animales que denominamos "grupo levadura" (KM) recibió una dosis diaria de 10^9 UFC de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 administrada individualmente en el buche de cada animal durante los primeros 7 días de vida (Figura 4.3). Un segundo grupo de 60 animales recibieron el antibiótico Bacitracina Metileno Disalicilatoutilizado (BMD) en las prácticas habituales como promotor de crecimiento. Y el tercer grupo de 60 pollos fueron denominados "grupo control" y recibieron su dieta habitual sin ningún suplemento. Los animales fueron mantenidos en salas climatizadas de acuerdo con la edad. Durante todo el ensayo el alimento y el agua fueron administrados *ad libitum* mediante comederos tipo tolva y bebederos automáticos. Los efectos sobre la eficiencia de producción se evaluaron teniendo en cuenta la evolución del peso de los pollos desde el nacimiento hasta el día 35. Además, se registró la cantidad de alimento ingerido por grupo. Los días 21 y 35, 5 aves de cada grupo fueron sacrificadas para su posterior necropsia. En ese momento, se evaluó la presencia de alteraciones macroscópicas, principalmente en sistema digestivo y de segmentos de duodeno, yeyuno e íleon mediante tinción con hematoxilina y eosina y observación al microscopio. Se realizaron recuentos en placa en medio MacConkey, Bilis Esculina y ázida, MRS y TSC (Ver anexo) para microorganismos coliformes; enterococos, bacterias lácticas y clostridios sulfito-reductores en el contenido intestinal de íleon y ciego de los pollos sacrificados, respectivamente (Redondo et al., 2016; Redondo et al., 2021). Antes del sacrificio, se tomó muestra de sangre de los animales y se determinó actividad transaminasa glutámico-oxalacética sérica, niveles de triglicéridos y colesteloremia en un autoanalizador Abbot Laboratories Aeroset empleando los sistemas de kits reactivos provistos por el fabricante. Estas determinaciones se realizaron en el Servicio Central de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

Figura 4.3: Esquema de ensayo de suplementación temprana con levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 a pollos parrileros.

RESULTADOS Y DISCUSION

Estudio preliminar sobre la suplementación con la cepa *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 a cerdas gestantes y sus lechones: forma de administración, palatabilidad, inocuidad y resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal.

La constitución de una microbiota adecuada es fundamental para el desarrollo armónico de cualquier mamífero. Este proceso se realiza a partir de la adquisición de microorganismos del entorno de cría, siendo fundamental el rol que cumple la madre y el proceso de amamantamiento. En el caso de la producción porcina la alimentación balanceada tendiente a maximizar la ganancia de peso condiciona también el establecimiento de la microbiota siendo el momento del destete y la transición a la alimentación sólida un paso crítico para la salud y el buen desarrollo del animal. Es conocido que uso de probióticos administrados tanto a la madre durante la gestación/lactancia como a las crías tiende a mejorar la salud gastrointestinal y contribuir a una constitución de microbiota óptima.

Con el objetivo general de evaluar la capacidad de *K. marxianus* CIDCA 9121 como probiótico de uso en cerdos, se realizó en las instalaciones de la Cátedra de Producción Porcina de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata un ensayo preliminar con un número reducido de animales para determinar las condiciones óptimas de administración del suplemento a cerdas gestantes y crías como primera alimentación.

Figura 4.4: Registros fotográficos de las parcelas con los animales involucrados en la experiencia. Los lechones del grupo levadura fueron numerados en verde y los del grupo control estaban separados espacialmente e identificados con letras en rojo.

Los animales se separaron en parcelas divididas por rejas como se observa en la Figura 4.4. El alimento balanceado se colocó en los comederos tipo tolva rojos mientras que la levadura se administró en forma individual en una única dosis diaria de $1x10^9$ UFC/Kg de alimento balanceado. Se prepararon porciones que denominamos "trufas" de 3g de biomasa húmeda de *K marxianus* CIDCA 9121 con recuento de 6 $x10^9$ UFC/g. Como la trufa en una primera instancia no fue aceptada por la cerda, se ensayaron formulaciones alternativas de trufas que pudieran mejorar la palatabilidad de la dosis. Se probaron diferentes aditivos, entre ellos permeado de lactosuero en diferentes proporciones, esencia de vainilla líquida, aceite de oliva, saborizante frutos rojos y saborizante neutro comúnmente utilizado en la producción de alimento balanceado. La aceptación de la cerda y los lechones a las diferentes formulaciones testeadas se muestran en la tabla 4.1. Finalmente, de todas las opciones disponibles y aceptadas, se decidió trabajar con la formulación que contenía permeado de lactosuero como aditivo debido a que constituía la opción más económica.

Tabla 4.1: Prueba de palatabilidad de "trufas" de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121.

MUESTRA	FORMULACIÓN	ACEPTACIÓN
Trufa levadura	biomasa de levaduras sin agregados	No
Trufa levadura + permeado	3g de biomasa + 3g de permeado	No
Trufa levadura + doble de permeado	3g de biomasa + 6g de permeado	Si
Trufa con aceite de oliva	3g de biomasa sumergida 1 min en aceite de oliva	Si
Trufa levadura + permeado + esencia de vainilla	3g de biomasa sumergida 1 min en esencia de vainilla y luego recubierta por permeado	Si
Levadura + saborizante frutos rojos	3g de biomasa + 0,0012g de saborizante + 6 g de permeado	Si
Levadura + saborizante neutro	3g de biomasa + 0,0012g de saborizante + 6 g de permeado	Si

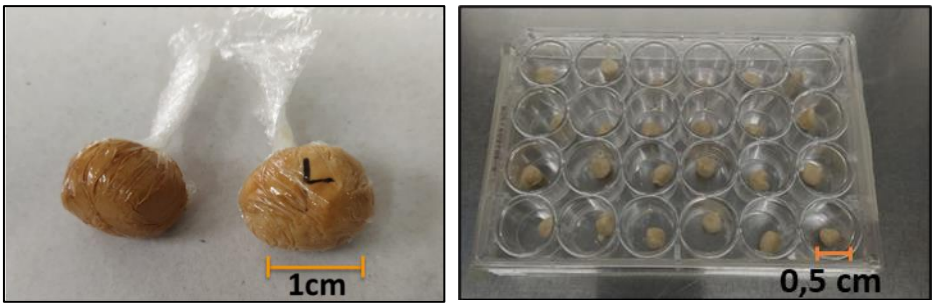


Figura 4.5: Dosis diaria de levadura en forma de "trufa" para cerda (izquierda) y dosis diarias para lechones (derecha).

Al cabo de 20 días de administración de la levadura, se produjo el parto en las cerda del grupo levadura y grupo control. Se registraron el número y el peso de lechones al nacimiento en los dos grupos (Figura 4.6).

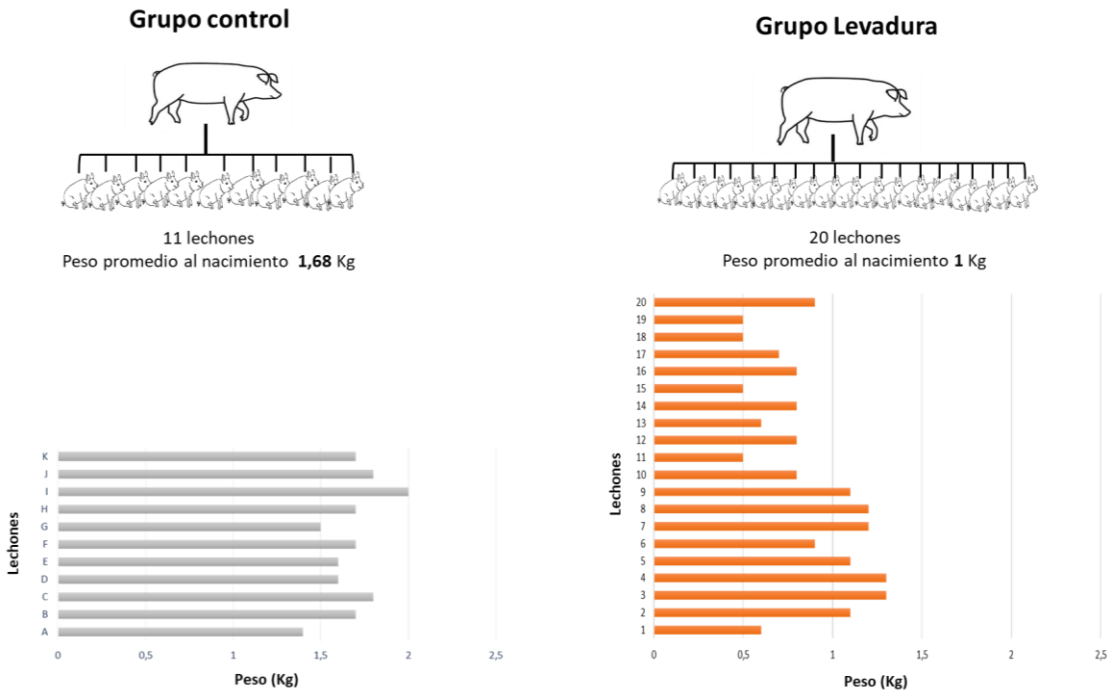


Figura 4.6: Registro de número de partos y pesos al nacimiento para cerda grupo control y cerda grupo levadura.

La camada de la cerda suplementada con levadura fue de 20 animales con un peso promedio de 1,00 ±0,20 Kg al nacimiento, mientras que la camada control fueron 11 animales de 1,68 ±0,16 Kg. La disparidad en el tamaño de las camadas no permitió sacar conclusiones respecto de los pesos individuales de los lechones al nacer. Esto tuvo también, implicancias en la mortalidad de los lechones post nacimiento, ya que un peso al nacer inferior a 1Kg se asocia con una alta mortalidad durante la lactancia. En este ensayo, el mayor número de decesos fue observado en el grupo levadura (n=9) y se asoció a lechones que nacieron con un peso menor o igual a 0,8Kg (Figura 4.6). Cabe destacar que, en este primer ensayo de prueba, con sólo 2 cerdas gestantes no fue posible cuidar factores tales como la genética, edad y números de partos previos de cada cerda, que constituyen los condicionantes principales del tamaño de camada (Manual Topigs Norsvin TN70, 2016).

El destete se define como la separación física del lechón de la madre donde el animal pasa de una alimentación líquida y templada a una alimentación seca y fría, siendo una de las etapas más estresantes en su vida. Los destetes pueden realizarse a los 14 días de vida del lechón (hiperprecoz) en el cual los animales alcanzan un peso de 4 a 5 Kg; el destete precoz, realizado

a los 21 días de vida obteniendo animales con un peso aproximado de 6 Kg; el destete conocido como funcional a los 28 días de vida, alcanzando y un peso igual o mayor a 8 Kg; y, el destete convencional o natural, que se produce entre los 42 a 63 días de vida del lechón pudiendo obtener un peso variable que va desde los 12 a los 18 Kg, disminuyendo el estrés que provoca un destete precoz, destetando animales ya adaptados a la alimentación sólida (Fages et al., 2021). En este ensayo, todos los lechones fueron destetados a los 28 días de vida, con una ganancia promedio de peso de 7,8 ±1,2 veces el peso al nacer para el grupo levadura, y de 5,5 ±1,0 veces en el grupo control. Todos los lechones alcanzaron al destete el peso esperado cercano a 8 Kg para ambos grupos. Cabe destacar que 2 animales del grupo control debieron ser sacrificados a causa de infecciones.

La ganancia de peso porcentual promedio desde el destete hasta la faena, del grupo suplementado con levaduras fue de 62,5 ±12,0% mientras que la del grupo control fue del 73,3 ±22,0%. Si bien el peso de faena de los lechones del grupo control fue levemente mayor que para el grupo levadura, en ambos casos la ganancia de peso se comportó de acuerdo con las tablas de crecimiento esperadas para su línea genética (Manual Topigs Norsvin, 2016). Cabe destacar que los lechones pertenecientes al grupo levadura que nacieron con menor peso pudieron prosperar hasta alcanzar los valores esperados, superando posibles consecuencias de una mala competencia por los nutrientes y la restricción de los recursos uterinos. Resultados similares fueron reportados por Zhang et al. (2020), al administrar *Bacillus subtilis* PB6 como probiótico a cerdas durante la gestación tardía y la lactancia.

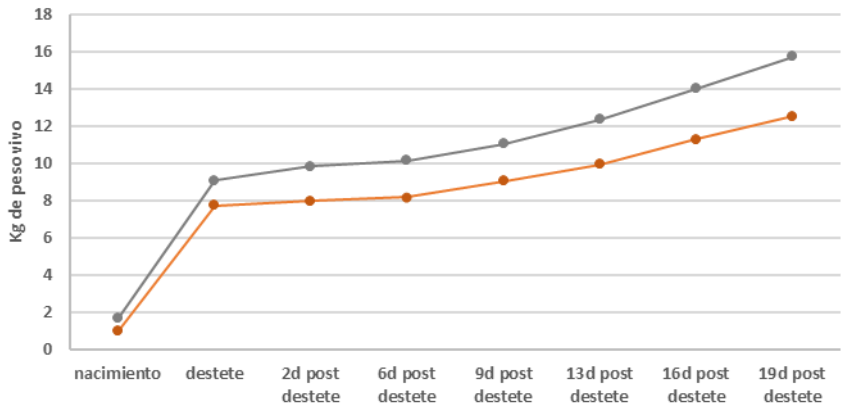


Figura 4.7.: Evolución de pesos promedio de lechones de grupo levadura (●) y grupo control (●).

Durante el transcurso del ensayo se recolectaron muestras de heces de los animales de cada grupo a diferentes tiempos para realizar análisis microbiológicos. Por un lado, la complejidad microbiológica de la muestra de materia fecal de las cerdas no permitió la detección de la

levadura *K marxianus* CIDCA 9121 por la técnica empleada, en tanto que, si se determinó la resistencia de la levadura probiótica al pasaje por el tracto gastrointestinal de los cerditos, recuperando entre $5x10^2$ y $5x10^3$ UFC/g de materia fecal de lechones suplementados. (Figura 4.8).

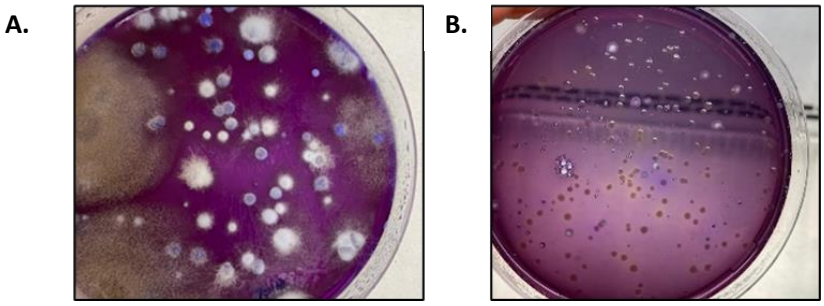


Figura 4.8: Placas de Petri con medio YPLC utilizado en recuento de levaduras en muestra de heces de cerda (**A**) y lechones (**B**). La levadura CIDCA 9121 presenta colonias amarillas en este medio de cultivo debido a su capacidad de fermentar la lactosa.

Por otra parte, se evaluó el contenido de hongos filamentosos, bacterias mesófilas totales, bacterias ácido-lácticas y enterobacterias mediante recuentos de microorganismos viables en placa. Un resultado interesante, fue que a los 8 como a los 12 días posdestete (36 y 40 días de vida) los análisis microbiológicos mostraron un recuento de enterobacterias en las heces del grupo que recibió la levadura del orden de cuatro veces menor respecto al hallado en heces del grupo control a tiempos similares (Figura 4.9). El destete de lechones trae consecuencias negativas para la microbiota intestinal, generalmente acompañada de eventos de disbiosis que hacen más susceptible al animal para contraer diferentes infecciones por enterobacterias patógenas oportunistas como *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella sp.* Las bacterias del género *Lactobacillus* tienen la capacidad de reducir el pH del cólon mediante la producción de ácido láctico, inhibiendo así el crecimiento de bacterias patógenas es por esto que un aumento en el número de bacterias lácticas se encuentra asociado con una microbiota sana (Zhao et al., 2019). Conway et al. (2022), ha reportado un aumento en la familia *Lactobacillaceae* y el género *Lactobacillus*, y una reducción en la abundancia de *Enterobacteriaceae* y *Campylobacter* en cerdas suplementadas con hidrolizado de levadura y su descendencia.

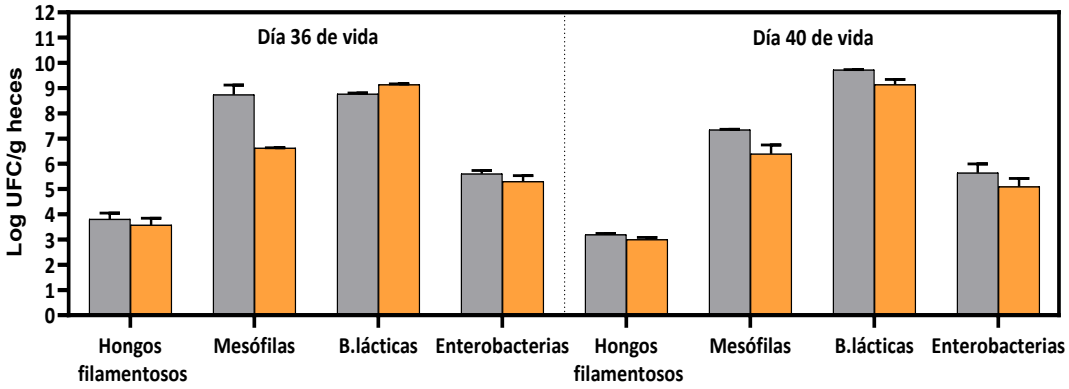


Figura 4.9: Recuento de microorganismos en muestras de heces de lechones del grupo control (barras ●) y grupo levadura (barras ●).

Además, se realizó un seguimiento de score de diarreas, observando el aspecto de las heces de los animales y registrando un puntaje a diario según el score que se muestra en la Figura 4.10. Durante el transcurso del ensayo, se registraron solo 2 casos de diarrea con score 2 y 3 en ambos grupos transcurridos 33 días desde el nacimiento.

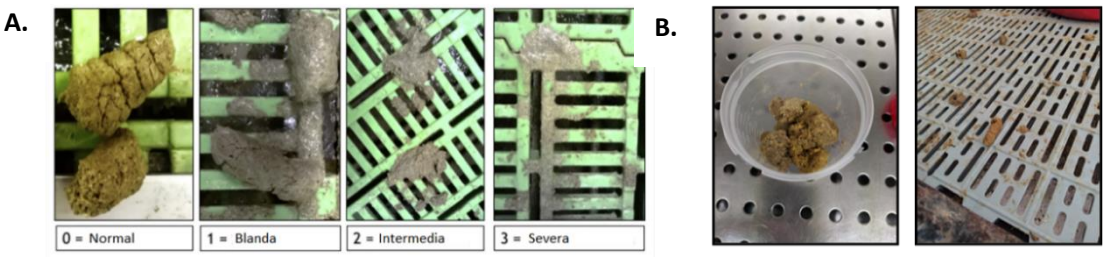


Figura 4.10: A. Score de diarrea adaptado de Perez-Calvo et al. (2019) **B**. Fotografías representativas del aspecto de las muestras heces recolectadas durante el ensayo.

Los resultados de este ensayo preliminar con un pequeño número de animales estudiados no permitieron generar conclusiones definitivas, sin embargo, cumplieron su objetivo ya que demostraron que es posible plantear la administración de *K. marxianus* CIDCA 9121 en una formulación que contenga permeado como aditivo con buena palatabilidad en cerdas y lechones. Además, se evidenció la resistencia de la cepa al pasaje gastrointestinal y no se mostraron efectos negativos en la conducta, la alimentación, aspecto de la materia fecal y la ganancia de peso de los animales. Esto permitió diseñar un ensayo de mayor alcance con un mayor número de animales y evaluación de parámetros productivos en granja.

Estudio de la suplementación con la cepa *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 liofilizada a cerdas gestantes, en lactancia y primera alimentación a lechones en granja productiva

El ensayo se llevó a cabo en una granja productiva, con la conformación de dos grupos experimentales de 8 cerdas gestantes y sus lechones. Las exigencias propias del trabajo cotidiano en granja hicieron que no fuera posible la administración de la levadura fresca refrigerada, por lo que este estudio implicó el uso de la levadura liofilizada y fraccionada tal como se detalla en Capitulo 3, lo cual se asemeja a la manera mediante la cual se administran raciones de diferentes suplementos/aditivos comerciales. Ambos grupos de cerdas recibieron alimento balanceado usado en la práctica habitual de la granja y, además, las cerdas pertenecientes al grupo levadura recibieron una dosis diaria de 1,4 g de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 liofilizada (conteniendo 5,5 x10^9 UFC/g) durante 20 días hasta el momento del parto. En condiciones de producción intensiva, la cerda está sometida a muchos factores estresantes como la repetición de servicios, cambios de alojamiento durante la gestación y la lactancia, que reducen su función inmune y aumentan la susceptibilidad a enfermedades (Peng et al., 2020). Además, la absorción de nutrientes por las cerdas durante la gestación y la lactancia influye en gran medida en las características de la camada al nacer y al destete. La microbiota intestinal juega un papel muy importante en la función y salud intestinal, mediando la absorción de nutrientes, el metabolismo, el sistema inmunológico y la resistencia a los patógenos (Zhang et al., 2020), por lo que la relación entre el embarazo y los cambios en la microbiota intestinal es motivo de especial atención. En este sentido, los probióticos han ganado amplia atención como estrategia adecuada para mejorar el estado de salud de las cerdas y su rendimiento

Para evaluar el efecto de la administración de *K. marxianus* CIDCA 9121 liofilizada durante el último período de gestación sobre diferentes parámetros reproductivos y vinculados al momento del parto, se registró la duración del parto promedio por camada y por lechón y el número total de lechones nacidos vivos (Tabla 4.2). La duración de un parto sin problemas (eutósico) es de 2 a 4 horas con intervalo 15 a 20 minutos de expulsión entre lechones. Intervalos superiores a estos o cuando han pasado más de 30 minutos desde el último lechón son indicativos de un parto distócico, y requiere de la asistencia externa (Fages et al. 2021). La duración de parto por camada fue de 3,45 h y 3,38 h para el grupo levadura y el grupo control, respectivamente, con intervalos de expulsión promedio de 13 minutos para ambos grupos. Para las cerdas del grupo tratamiento se registraron un total de 120 lechones nacieron vivos; para el grupo control se obtuvieron 123 fueron lechones vivos. Durante los primeros días post parto, se registraron un total de 17 lechones muertos para el grupo control y 13 para el grupo tratamiento, estos decesos se asociaron a muerte por asfixia/aplastamiento y por nacimiento

con bajo peso. Cabe destacar que, el registro de decesos durante nacimiento y posparto se encontró dentro de los porcentajes esperados por la granja (Tabla 4.2). Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en la performance de nacimiento de lechones de las camadas provenientes de cerdas suplementadas con levadura y las del grupo control. Existen ciertas discrepancias en bibliografía respecto al efecto de la suplementación con levaduras probióticas a cerdas gestantes, algunos autores como Zanello et al. (2013), Jang et al.(2013) y Peng et al. (2020), quienes evaluaron los efectos de administración se *Saccharomyces cerevisiae y Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* a cerdas gestantes durante la última fase de gestación y lactancia, no observaron diferencias significativas en el tamaño de camada y lechones nacidos vivos. Sin embargo, un trabajo recientemente publicado donde se trabajó con un número mayor de animales, alrededor de 100 cerdas gestantes, los tratamientos con diferentes dosis de levadura *S. boulardii* tendieron a aumentar el número de lechones nacidos vivos en un rango de 13,3 a 14,7 lechones promedio por cerda (Domingo et al., 2021).

Tabla 4.2: Efecto de la administración de levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 liofilizada a cerdas al final de la gestación y durante la lactancia sobre el rendimiento de la camada. Se muestran los promedios calculados por grupo.

Parámetros	***Grupo Control***	DS	***Grupo Levadura***	DS
Cantidad de cerdas	8		8	
Lechones nacidos vivos	123		120	
Tamaño de camada	15,37	5,00	15,00	2,14
Duración de parto por camada (h)	3,45	0,05	3,48	0,05
Intervalo de expulsión (min)	13,00	0,02	13,00	0,03
Peso promedio de lechones (Kg)				
al nacimiento	1,37	0,15	1,60	0,19
a los 14 días	4,24	0,53	4,53	0,55
al destete	6,04	0,38	6,04	0,84

La nutrición de la cerda juega un papel sustancial en la uniformidad de la camada. A medida que el tamaño de camada aumenta, la cantidad de nutrientes disponibles por feto disminuye debido al incremento de la competencia fetal, lo que se ha relacionado con el desarrollo fetal sub-óptimo. Por lo tanto, el rendimiento reproductivo de cerda, en términos de mejora de

crecimiento y desarrollo fetal, se puede optimizar con la alimentación, con una suplementación ideal de aminoácidos y energía durante la gestación (Fages et al., 2021). Los lechones al nacimiento deben pesar aproximadamente 1,2-1,8 Kg cada uno, aunque en la actualidad debido a la gran presión de selección por parte de las empresas de genética se han obtenido hembras hiperprolíficas, logrando un mayor número de lechones en cada parto, pero con un menor peso al nacimiento. Algunos autores utilizan como valor de corte de 0,815 Kg como valor de decisión, con tasas de sensibilidad (capacidad de predecir los animales que van a llegar al final del proceso) y especificidad (capacidad de predecir los animales que no van a morir antes de llegar al matadero) iguales a 62,4 %. Otros autores han abordado el estudio de la relación entre el peso al nacimiento y la mortalidad o supervivencia durante la fase de lactación determinando valores de corte entre 1,0 -1,1 Kg (Feldpauschet al., 2019). De todos modos, debe tenerse en cuenta que cada productor puede elegir un punto de corte y conocer la sensibilidad y especificidad asociado a la decisión de ese valor (Crespo y Gadea, 2020).

Los pesos registrados al nacimiento estuvieron todos por encima de los valores de corte para ambos grupos y el peso de los lechones al nacer fue significativamente mayor para el grupo levadura ($p<0,0001$) (Tabla 4.2) obteniendose un peso total promedio por camada de 24 Kg para el grupo levadura y 21 Kg para el grupo control. Sin embargo, en nuestra experiencia, la evolución de los pesos de los lechones durante el periodo de lactancia no mostró diferencias entre los grupos, obteniendose lechones promedio de 6 Kg al destete (21 días de vida). Rendimientos similares fueron obtenidos por otros autores donde se estudió la suplementación de cerdas gestantes y sus lechones con levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-4407 (Actisaf, Phileo Lesaffre Animal Care, Marcq-en-Bareoul, France) en una dosis de 10^{10} UFC/g y *S. boulardii* (Levucell SB20), con pesos de lechones promedio por camada de 1,3 Kg, sin diferencias significativas respecto a los grupos control (Peng at al., 2020, Domingo et al., 2021). A diferencia de lo observado en este trabajo, Domingo et al.(2021), resgitró un mayor incremento en el peso de los lechones pertenecientes a los grupos suplementados con la levadura durante la lactancia, y mayor fue la diferencia cuanto mayor fue la dosis de levadura *S. boulardii* suministrada a la cerdas durante los ultimos dias de gestación y lactancia.

La leche materna es la fuente de nutrición única para los lechones al nacimiento. Durante la gestación y la lactancia, la glándula mamaria es uno de los tejidos más activos de las cerdas. Para proporcionar una buena nutrición a los lechones, una gran cantidad de nutrientes absorbidos por el intestino se transportan a las glándulas mamarias a través de la circulación sanguínea para sintetizar la leche. El nivel de nutrientes en la dieta es un factor importante que afecta la síntesis y composición de la leche, así como su relación con los microorganismos presentes en el

intestino de la cerda. Algunos trabajos han demostrado que una microbiota beneficiosa contribuye a una mayor producción de ácidos grasos de cadena corta, reflejándose en una mayor disponibilidad de energía para la producción de calostro (Liu et al., 2008; Hasan et al., 2018). Estos factores dan como resultado cambios en la composición de la leche que se transmiten de la madre a la descendencia a través de la lactancia (Zhang et al.,2020).

El calostro es la primer secreción mamaria y está compuesta por una mayor concentración de proteínas, vitaminas, minerales y grasa con relación a la leche. Casi el 80% de las proteínas presentes son inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA (Inoue & Tsukahara, 2021). Casi el 100% de la IgG encontrada en calostro proviene del suero materno, mientras que para IgA más del 50% se produce localmente en la glándula mamaria (Maciag et al., 2022). La inmunoglobulina calostral predominante es IgG, seguida por la IgA e IgM con concentraciones que no son constantes, sino que disminuyen durante las primeras 24 horas posparto, siendo la disminución en el nivel de IgG más drástica que las otras(Markowska-Daniel et al., 2010). Los tres tipos de inmunoglobulinas son translocadas por la mucosa intestinal del lechón y le confieren una inmunidad pasiva. Es por esto que el calostro además de su función nutricional tiene un rol fundamental en la salud de los lechones.

Se determinó la concentración IgA en calostro de menos de 24h posparto (Figura 4.11). El dosaje de IgA no mostró diferencias significativas entre cerdas de diferentes grupos. Este resultado es coincidente con los trabajos de Zanello et. al,(2013) y Jang et al. (2015) quienes han detectado un aumento de la concentración de IgG en el calostro y el plasma de la progenie del grupo suplementado con levadura, pero no observaron diferencias significativas en el dosaje de IgA en calostro de cerdas de diferentes grupos.

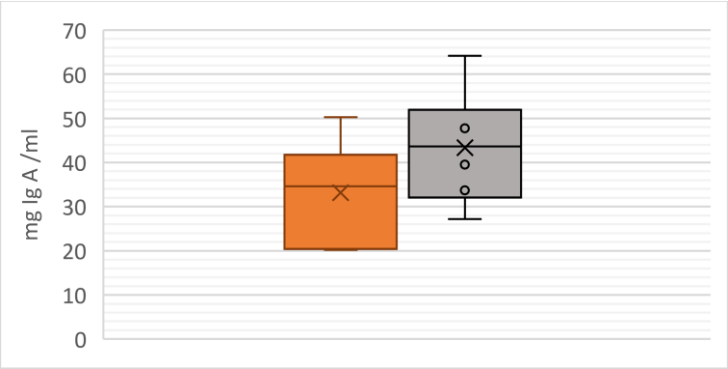


Figura 4.11 : Dosaje de Ig A en calostro por técnica de ELISA. Para cerdas de grupo control (●) y grupo tratamiento (●).

Como se mencionó anteriormente, el intestino de los lechones al nacimiento es estéril y su colonización se va forjando por contacto con la flora del canal de parto, la heces de las cerdas, el contacto con otros lechones y el ambiente que lo circunda. Esto implica que los primeros días de vida sean propensos a contraer infecciones que puedan causar diarreas y retrasos en el crecimiento, que luego se puede ver agravado al momento del destete. En este ensayo, durante el periodo de lactancia se registraron algunos pocos casos de diarrea, con mayor gravedad y duración en el grupo control (Figura 4.12).

ID CERDA	*grupo*	Episodio de diarrea	Score
BTLA 0464	*levadura*	días 12 y 13	1
BTLA 0417	*control*	días 13 y 14	3-2
BTLA 5817	*control*	días 13, 14 y 17	2-2-2

Figura 4.12 : Tabla con score de diarrea para lechones durante 21 días de lactancia. Registro fotográfico de diarrea con score de 3.

Al finalizar el periodo de lactancia se cesó la administración de la levadura a las cerdas del grupo tratado y se comenzó la suplementación a sus lechones. La dosis de *K. marxinaus CIDCA 9121* liofilizada fue de $1x10^9$ UFC/lechón/día y tras 3 semanas de administración se realizaron pesajes de los lechones por grupos. A los 58 días de tratamiento, se observó una diferencia significativa en el peso total de las camadas entre grupos, con una ganancia de 200 kg de peso vivo en el grupo tratamiento acompañada de una mayor homogeneidad en la distribución de pesos, con ventajas productivas para la granja (Figura 4.13, A). Incluso, cabe destacar que la ganancia de peso en los lechones del grupo levadura se mantuvo por encima a la del grupo control luego de 32 días de haber suspendido la administración del probiótico (Figura 4.13, B).

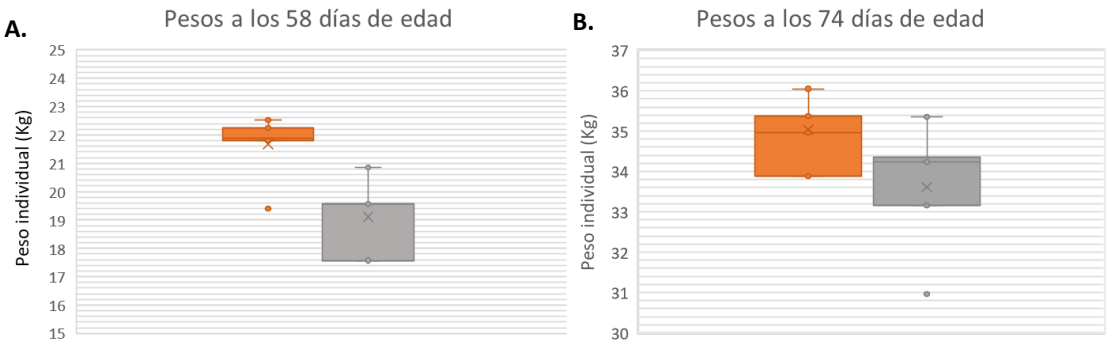


Figura 4.13: Peso promedio por camada en kilogramos de peso vivo de lechones a los (**A**) 58 y (**B**) 74 días de vida: grupo control (●) y grupo tratamiento (●).

La inmadurez intestinal o estrés en los lechones pueden provocar un aumento de permeabilidad intestinal y con esto un aumento de translocación distintas moleculas derivadas de la microbiota que presentan alta inmunogenicidad. Entre ellas, la flagelina, constituyente principal del flagelo bacteriano muestra alta inmunogenicidad y se ha propuesto que los niveles de anticuerpos anti-flagelina indican una mayor permisividad de la barrera intestinal, tanto por episodios esporádicos como permenentes, pero dificiles de detectar por otros métodos (Ziegler et al., 2008; Vermandere et al., 2021). En nuestro experimento, se realizó una medición de anticuerpo antiflagelina en sangre de lechones a los 19 y 25 días de vida, es decir pre-destete y pos destete. Los valores obtenidos para las muestras de sangre de lechones de cada grupo fueron bajos y no se observaron diferencias significativas entre ellos, aunque el grupo levadura presentó menos dispersión de los datos (Figura 4.14, A y B). Para este ensayo se utilizó flagelina de *Salmonella entérica* y puede que este microorganismos no sea el patógeno más representativo para los lechones en este período.

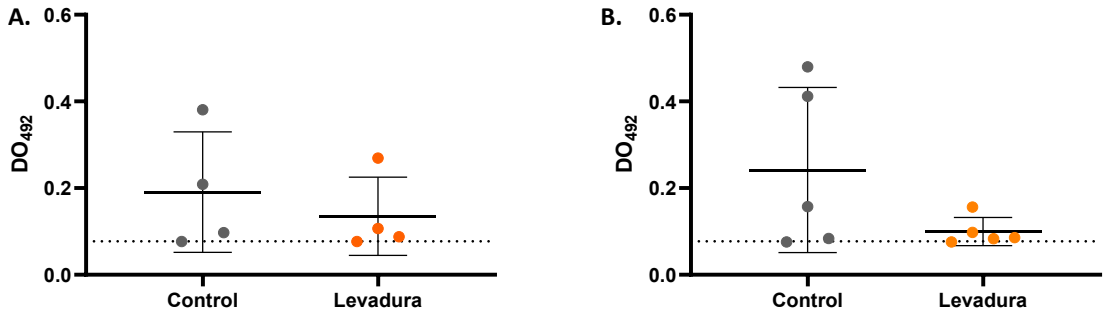


Figura 4.14: Medición de anticuerpos anti-flagelina de *Salmonella* en lechones (n=5) de ambos grupos a los 19 días (**A**) y 25 días de vida (**B**) .

Tambien se evaluó los niveles de IgG sérica para lechones posdestete y no se encontraron diferencias significativas entre grupos tratado y control. Otros autores han documentado valores séricos de IgG de entre 5,3 mg/ml comparables con los obtenidos en este trabajo, y tambien valores de 11 mg/ml para grupo de lechones nacidos de cerdas que recibieron suplementacion con 10^6 UFC/g de *S. cerevisiae* SC47 (Jang et al., 2015). No obstante, dado que la IgG en los lechones se atribuye a la incorporada en la lactancia, estas discrepancia en el dosaje puede explicarse por el momento en que se realizó cada uno, en el caso del trabajo citado la medicion de IgG sérica se realizó a los 21 días de lactancia, mientras que en nuestro trabajo el dosaje fue hecho 4 días post-destete.

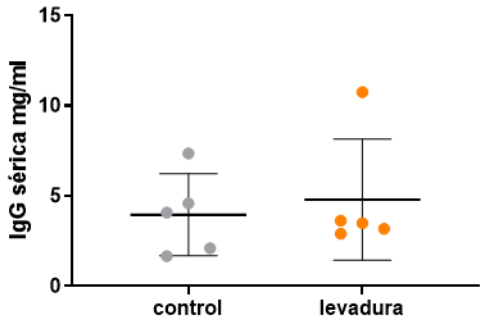


Figura 4.15: Medición de anticuerpos Ig G sérica (n=5) de ambos grupos a los 27 días de vida.

Para estudiar los cambios intestinales y sistémicos en respuesta al destete uno de los biomarcadores utilizado fue la medición de citrulina en sangre. La citrulinemia se ha utilizado en humanos como biomarcador de la actividad metabólica intestinal y la masa de enterocitos en diversas enteropatías como la enfermedad de Crohn, atrofia de las vellosidades, mucositis y rechazo agudo en el trasplante intestinal. La citrulina es un aminoácido no proteico sintetizado íntegramente por los enterocitos en los segmentos proximales del intestino delgado (Berkeveld et al., 2008). En el presente trabajo se realizó la medición de lo citrulina plasmática 5 días posdestete (26 días de vida) y se observó un efecto positivo sobre los niveles de citrulina en los lechones del grupo que recibió levadura en su alimentación (Figura 4.16). Soraci et al.,(2023) demostró que la citrulinemia medida en un solo día durante la fase aguda del estrés (día 4 - 8 después del destete) puede usarse como indicador del rendimiento del crecimiento a lo largo de todo el período posdestete, donde un aumento en la citrulinemia durante el período posdestete temprano indica una mejor función intestinal a lo largo del desarrollo del lechón de recria.

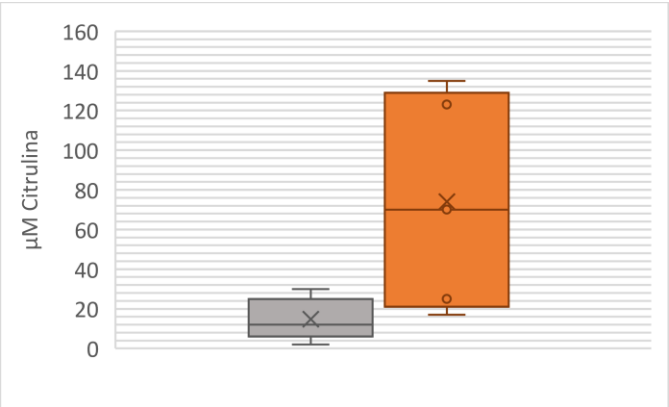


Figura 4.16: Medición de citrulina plasmáticas en lechones (n=5) de ambos grupos a los 5 días posdestete. Grupo control (●) y grupo levadura (●)

La distribución tisular del metabolismo de la citrulina involucra, especialmente, el intestino delgado, el hígado y los riñones, con tres importantes reacciones químicas: transformación intrahepática de amonio en urea, síntesis de la citrulina a partir de la glutamina en el intestino y síntesis de arginina a patir de citrulina en los riñones (Figura 4.17).

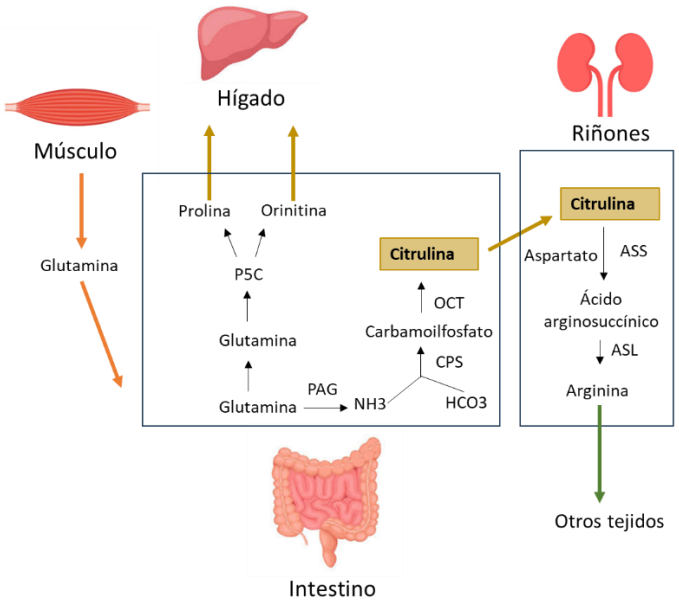


Figura 4.17: Metabolismo de citrulina . Adaptado Curis et al. (2005). P5C: pirrolina-5-carboxilato; PAG: glutaminasa; CPS: sintetasa de carbamoilfosfato; OCT: ornitinacarbamoil transferasa; ASL: liasa de argininosuccinato; ASS: sintetasa argininosuccinato

En los cerdos, los precursores de la citrulina son los aminoácidos más abundantes de la dieta, la L-glutamina y el L-glutamato. Tras su síntesis, la citrulina se libera a través de la membrana basolateral del epitelio intestinal hacia la circulación portal para pasar a circulación sistémica (Soraci etal., 2023). En el intestino, principalmente en yeyuno, se produce la mayoría de la citrulina circulante a partir de la glutamina, y mediante el catabolismo, aproximadamente el 83% de la citrulina plasmática se convierte en arginina, precursora esencial del óxido nítrico, en los túbulos proximales. En el hígado, la citrulina es un metabolito intermediario del ciclo de la urea, su precursor es la ornitina y podría tener implicancias en el metabolismo de otros aminoacidos nitrogenados. Por este motivo, se evaluó el perfil de ciertos aminoacidos como: ornitina, glutamina, ac. glutámico, prolina y arginina de los lechones posdestete. Se observaron tendencias positivas para las muestras del grupo tratado en las mediciones de todos los aminoácidos determinados, correlacionando con el comportamiento de la citrulinemia en los animales del mismo grupo.

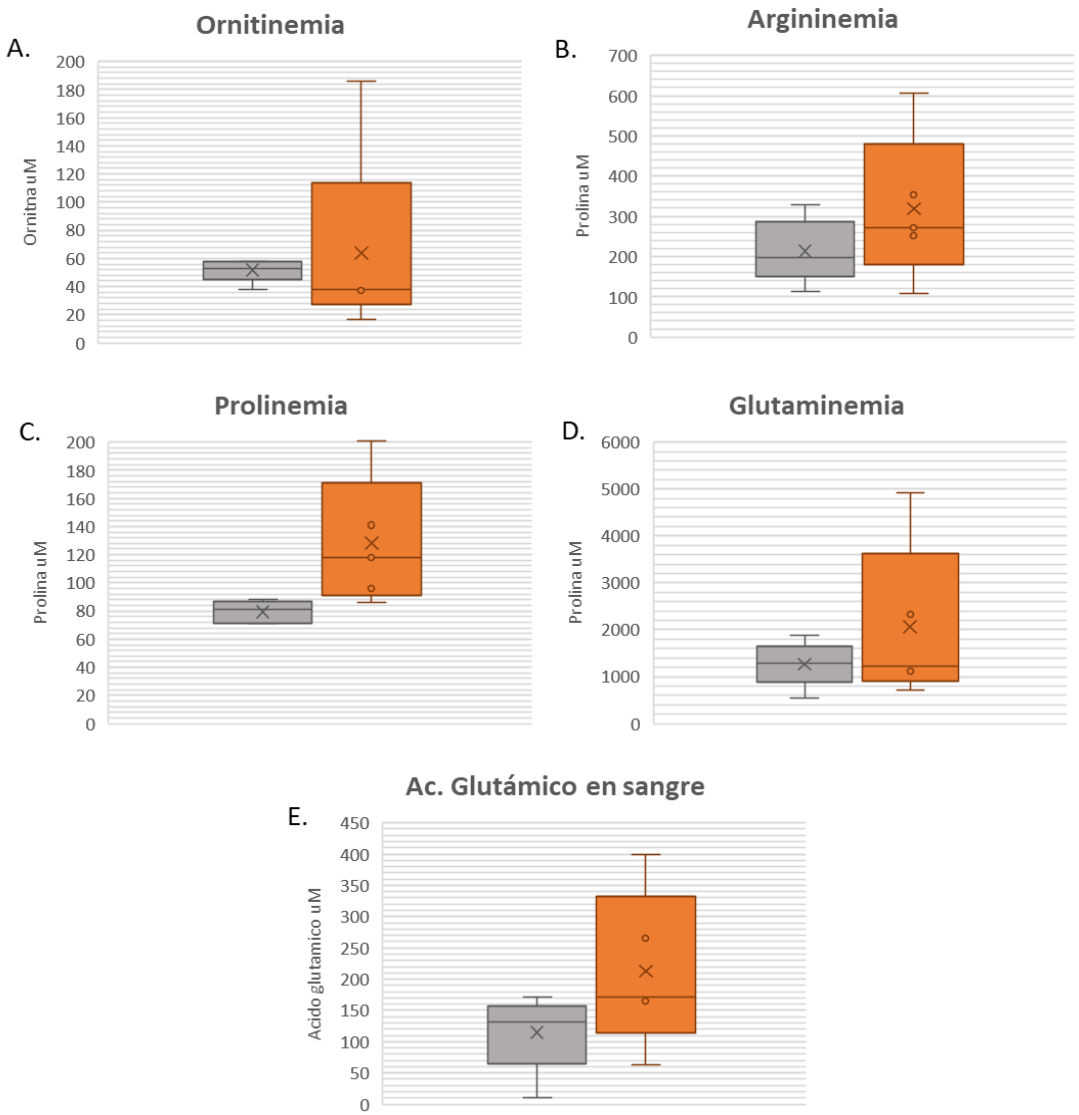


Figura 4.18: Perfiles de aminoácidos nitrogenados en sangre de lechones 5 días posdestete. Grupo control (●) y grupo levadura (●)

La suplementación de cerdas en la fase tardía de gestación y lactancia con levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 liofilizada no mostró cambios significativos en los parámetros reproductivos de la facilidad de parto, el tamaño de camada y la cantidad de lechones nacidos vivos. Tampoco se observaron diferencias en la cantidad y calidad del calostro producido. Sin embargo, se observó un efecto positivo en la ganancia de peso de los lechones pos-destete nacidos de cerdas suplementadas con levadura, a los que también se les administró el probiótico al finalizar la lactancia materna. Los lechones suplementados, mostraron un mejor perfil de citrulina y aminoácidos séricos que evidencian un menor impacto del estrés al destete sobre la mucosa intestinal y correlaciona con un mejor desempeño productivo. Futuros ensayos deben realizarse para tratar de dilucidar el/ los mecanismos por los cuales la levadura puede estar ejerciendo

estos efectos sobre la ganancia de peso de lechones de producción con un aumento en el número de animales por experimento.

Estudio la suplementación temprana con la cepa *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 a pollos parrilleros

La línea genética de pollos Cobb500 se caracteriza por su peso corporal competitivo desde el inicio de su vida productiva, poseer un buen ritmo de crecimiento con respecto a la masa corporal y el aprovechamiento más eficiente del alimento durante las primeras semanas de vida. A fin de evaluar los efectos de la suplementación con levadura probiótica en los primeros días de vida, realizamos un experimento en corrales experimentales del Instituto de Patobiología del INTA Castelar, en colaboración con el Dr. Leandro Redondo. En este experimento, todos los pollos recibieron la alimentación correspondiente a su estadío, y aunque la administración de levadura solo se realizó durante los primeros 7 días de vida, el seguimiento de los animales se continuó durante las primeras 6 semanas de vida. Se emplearon dos grupos control, uno que recibió el plan de alimentación convencional (denominado como control, de aquí en adelante) y otro que a su vez recibió una suplementación con antibiotico bacitracina para emular las condiciones de uso preventivo de antibiotico (denominado grupo BDM de aquí en adelante).
El desarrollo productivo de pollos parrilleros está caracterizado principalmente por dos variables, la ganancia de peso corporal y el índice de conversión alimenticia. Se evaluó el peso corporal de los pollos en cada grupo durante 6 semanas de vida y se observó que el peso corporal promedio, así como la ganancia de peso durante el período de crianza fue similar entre tratamientos (Figura 4.19).

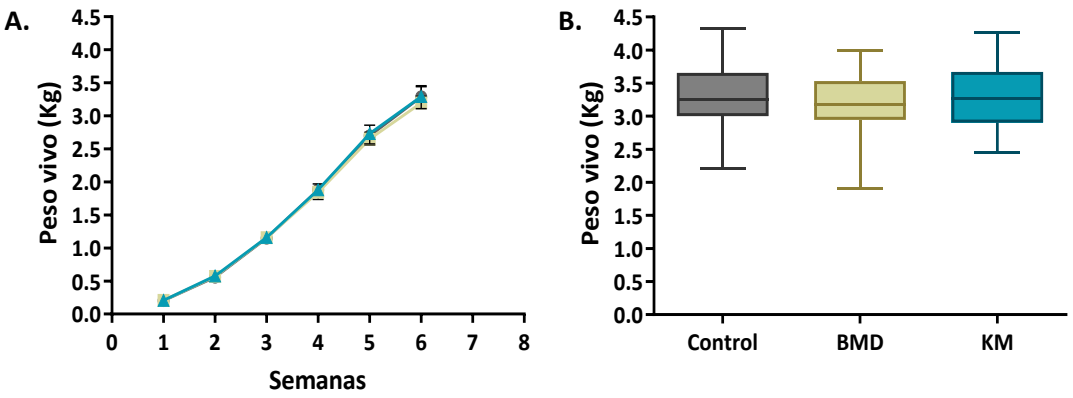


Figura 4.19: A. Evolución de peso promedio de animales por grupo **B**. Peso promedio por grupo al día 42 de vida. Grupo control (●); grupo levadura (●) y grupo BMD (●).

Los pesos corporales en la línea de pollos Cobb500 se esperan que sean de 0,043 Kg al nacimiento, 0,170 Kg a los 7 días, 0,460 kg a los 14 días, 1,44 Kg a los 28 días, 2,73 Kg a los 42 días y llegar a los 3,37 Kg a los 49 días de vida (Mouffok et al.,2019). Podemos decir que el crecimiento de los pollos ha sido en concordancia a las curvas de ganancia esperadas para la línea genética utilizada, observándose un leve efecto positivo a favor del grupo levadura a los 42 días (figura 4.20, A y B).

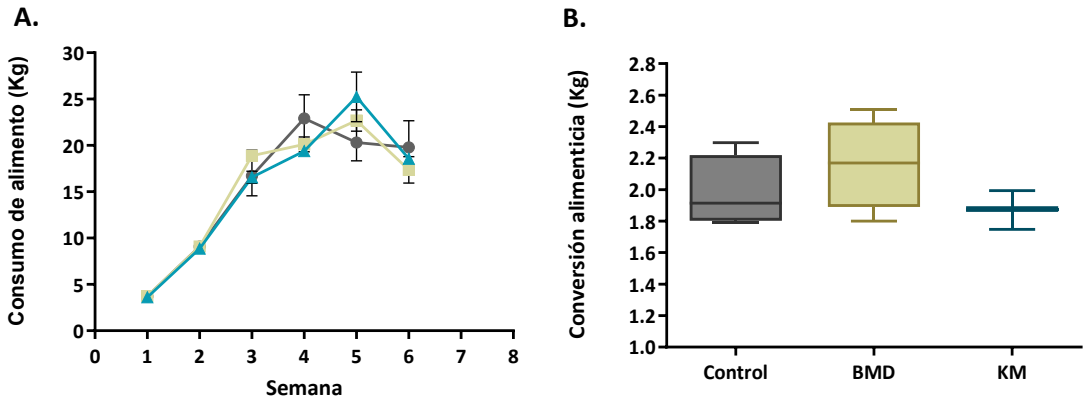


Figura 4.20: A. Consumo de alimento promedio por grupo por semana de vida **B**. Conversión alimenticia calculada como consumo promedio de alimento /peso vivo por grupo a las 6 semanas. Grupo control (●); grupo levadura (●) y grupo BMD (●).

La conversión alimenticia indica cuánto alimento se necesita para producir un kilo de carne y se obtiene calculando la cantidad de alimento que un pollo consume diariamente en relación con el aumento de peso. La conversión alimenticia esperada a los 42 días es de 1,7 (Mouffok et al., 2019), en nuestro ensayo los valores obtenidos a los 42 días fueron de 1,87 para el grupo levadura, 1,97 para el grupo control y 2,16 para el grupo BDM. Como el alimento es el mayor costo en la producción avícola, pequeñas mejoras en la eficiencia del uso del alimento tienen un impacto económico significativo. La mejora en el rendimiento y la productividad de las aves de corral debido al uso de probióticos en los alimentos se ha una mejor eficiencia alimenticia. Este resultado permite evidenciar que la suplementación con levadura tendría un efecto positivo sobre la conversión de alimento en biomasa, debido a que los animales del grupo levadura alcanzaron un desarrollo esperado y comparable con los otros grupos con un menor consumo de alimento. En algunos trabajos publicados, la suplementación con probióticos además de mejorar las barreras epiteliales, los probióticos pueden mejorar la absorción de nutrientes, estimulando la actividad de enzimas digestivas, mejorando el metabolismo de los minerales y la síntesis de vitaminas (biotina, vitaminas B1, B2, B12 y K), que son esenciales para el crecimiento y el metabolismo adecuados de los pollos (Dahma et al., 2008; Wang et al., 2010; Aliyi et al., 2023). Además, los resultados obtenidos fueron comparables con los reportados por Lin et al.,

(2023), donde se ha suplementado la alimentación de pollos con hidrolizado de levadura *S. cerevisiae* y por Sun et al., (2019) donde se suplementó a pollos con una mezcla de levadura *S. cerevisiae* y *K. marxinanus*. Wang et al., (2017) reportó que la administración de *Kluyveromyces marxianus* FIM-1, mejoraba no solo la conversión alimenticia sino también el peso final de los pollos a los 42 días de vida. Es importante destacar que esos resultados fueron obtenidos bajo la suplementación con levadura durante los 42 días de experimento y con dosis 20 veces más elevadas que la del presente ensayo.

El intestino de los pollos al nacimiento se encuentra prácticamente estéril, desarrollando su microbiota intestinal durante las primeras semanas de vida, donde predominan las bacterias del género *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bacillus*. Esta microbiota autóctona es específica y está determinada por las condiciones físicas y químicas existentes en su aparato digestivo (Dittoe et al., 2022). Los suplementos probióticos se utilizan para preservar un equilibrio microbiano saludable dentro del intestino promoviendo la integridad intestinal y previniendo enfermedades entéricas. Esto se puede lograr mediante el establecimiento y mantenimiento de una microflora intestinal saludable, mejora de la digestión y utilización de nutrientes, exclusión competitiva de bacterias/patógenos dañinos, disminución del pH, neutralización de toxinas, competencia por nutrientes con patógenos, reducción de la producción de amoníaco y estimulación del sistema inmunológico (Aliyi et al., 2023).

Se efectuó un análisis microbiológico sobre muestras de contenido intestinal del ciego e íleon obtenidas del sacrificio de 5 animales por grupo (Figura 4.21). A los 21 días de vida de los pollos, la composición microbiana de los contenidos intestinales no mostró diferencias significativas entre grupos. Sin embargo, los resultados revelaron que en íleon hay más cantidad de bacterias acidolácticas y menos coliformes en los pollos suplementados con levadura con respecto a los otros grupos. Este efecto positivo sobre la conformación de la microbiota podría indicarnos que la suplementación temprana con levaduras tiene impacto en la microbiota intestinal de los pollos en forma duradera. Wang et al., (2017), estudió la comunidad microbiana presente en el íleon mediante la secuenciación de gen 16s ARN, y observó un aumento de *Firmicutes*, *Clostridiales* and *Lactobacillales* (Lactobacillus en particular) y disminución de *Cyanobacteria*, aunque solo para el grupo con una dosis de *K.marxianus* administrada del orden de $4{,}5 \times 10^{10}$ UFC/Kg.

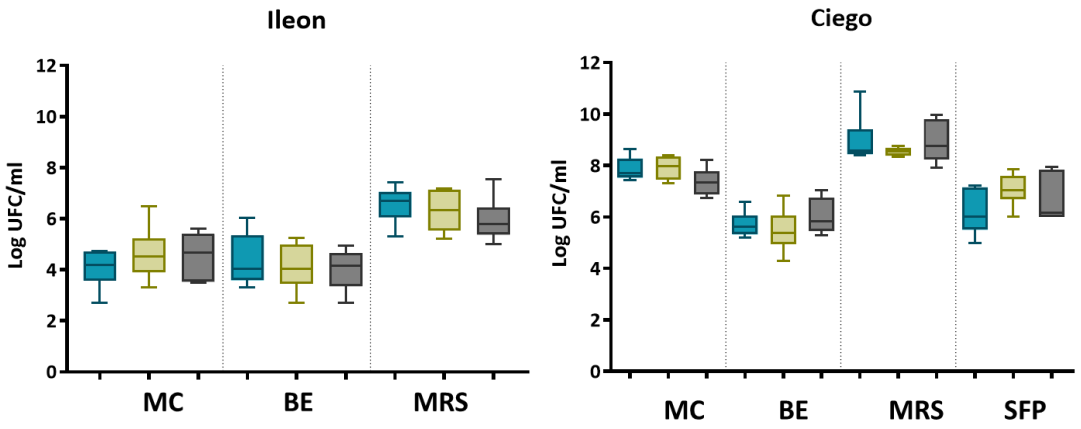


Figura 4.21: Recuento de microorganismos presentes en íleon y ciego para pollos (n=5) de grupo control (●); grupo levadura (●) y grupo BMD (●). MC: bacterias coliformes. BE: enterococos; MRS: bacterias acido lácticas; SFP: clostridios sulfito-reductores. El analisis estadístico se realizó por el Test Kruskal-Wallis-Dunn y no se orbservaron diferencias significativas entre los grupos.

Debido a la corta longitud del tracto gastrointestinal presente en los pollos, el tiempo de residencia del alimento en el intestino es corto por lo tanto, en la práctica es importante prestar atención a factores que mejoren la absorción de nutrientes en la formulación. Una mejoría en la arquitectura histologica intestinal es acompañada, en general, por una mejor función digestiva y capacidad de absorción de nutrientes, lo cual contribuye directamente al rendimiento en crecimiento en los pollos de engorde. En este sentido, dado el rol que cumplen las vellosidades intestinales en la absorción de nutrientes, se observa una buena correlación entre la longitud de las vellosidades y la capacidad absortiva. En nuestro experimento, los análisis histopatológicos realizados a los 21 días, revelaron una mejoría significativa en el tamaño de las vellosidades y criptas para pollos que recibieron suplementacion temprana con levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 (Figura 4.22) y fueron consistentes con los reportado por otros autores (Wang., et al 2017; Lin et al., 2023).

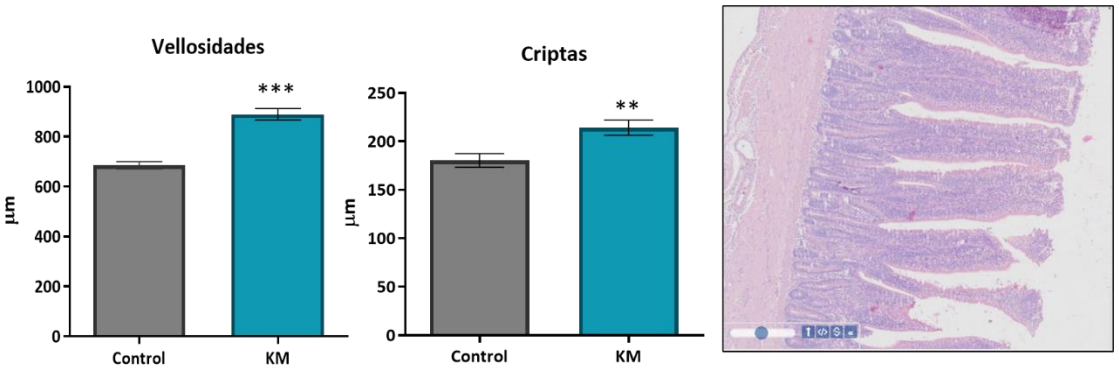


Figura 4.22: Análisis histológico de tamaño de vellosidad y criptas en muestras de intestino delgado en pollos (n=5) de grupo control (●); grupo levadura (●) a los 21 días de vida. ***p<0,005; ** p<0,01

El hígado se define como el órgano interno principal de las aves de corral y ejerce una variedad de funciones metabólicas y homeostáticas que incluyen digestión, metabolismo, biosíntesis, excreción y desintoxicación. Alteraciones en la función hepática pueden amenazar la salud de los animales y reducir el rendimiento del crecimiento, provocando pérdidas económicas a la industria avícola (Zaefarian et al., 2019).

Los estudios histológicos de hígado, revelaron una estructura de los hepatocitos del grupo levadura con núcleos celulares de aspecto normal, con una distribucion de cromatina y citoplasma sin alteraciones visibles. Esto se diferenció notablemente de a histología presente para pollos del grupo control donde se observaron hepatocitos con áreas de degeneración intracitoplasmática, vacuolización y aumento de gotas lipídicas (Figura 4.23). En los pollos parrilleros es frecuente el desarrollo de hígado graso debido a la dieta que cosumen. Otros autores han visto una histología similar con depósitos de lípidos en hígado de pollos expuesto a alimentos contaminados con aflatoxinas. El hígado es el órgano diana de las aflatoxinas y los daños hepatobiliares se asocian con alteraciones en las enzimas de la función hepática. Los hongos productores de micotoxinas son responsables de importantes pérdidas financieras que abarcan un amplio espectro de cultivos y animales de granja y se extienden a lo largo de la cadena alimentaria hasta el consumidor. Esto es imporante porque la contaminación de alimento con diferentes micotoxinas producen perdidas en la ganancia de peso de los pollos en un 5% por cada mg/kg de aumento de aflatoxina en la dieta (Allameh et al., 2005; Magnoli et al., 2017 ; Perali et al., 2020; Guo et al., 2023). En otros trabajos, se han registrado alteraciones hepáticas atribuidas a la dieta en pollos con desarrollo de miopatías por deposito tisular de lípidos, lo que constituye una pérdida de calidad para la producción de carne aviar (Xing et al., 2021)

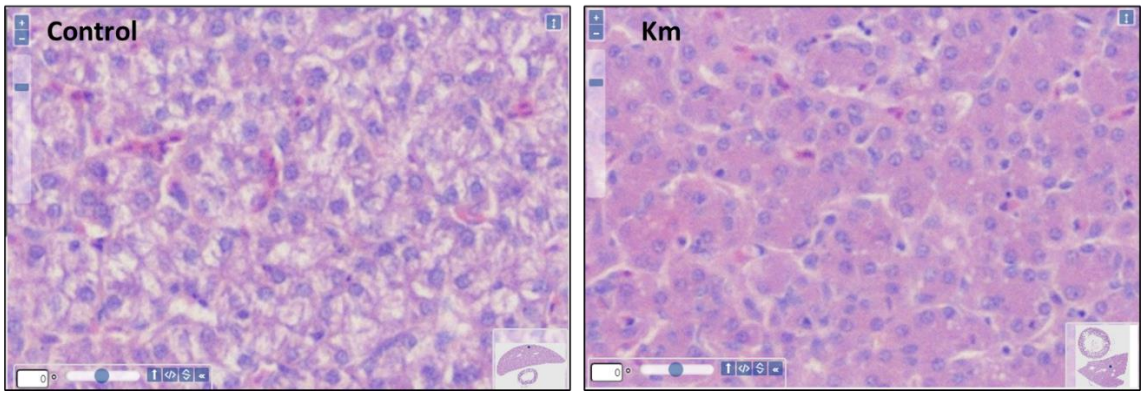


Figura 4.23: Micrografías de cortes hepáticos teñidos con hemotolixina y eosina del grupo control y grupo que recibió tratamiento con levadura (Km)

La lesión del tejido hepático puede provocar la liberación de varias enzimas hepáticas al torrente sanguíneo. Los aumentos en los niveles plasmáticos de aminotransferasas se utilizan ampliamente como marcadores de diagnóstico de daño hepático (Li et al., 2019).

Asi como el aumento de transaminasas hepáticas son indicativos de sufrimiento hépatico, un aumento de trigliceridos en sangre pueden ser inidicadores de estrés metabólico (Xing et al., 2021). Por este motivo se realizaron mediciones en sangre de transaminasas hepáticas, triglicéridos y colesterol a los días 21 y 35 de vida de los pollos. Estos análisis permitieron evidenciar que la suplementación temprana con levaduras tendría un efecto positivo en parámetros metabólicos mostrando un descenso significativo de los valores de transaminansas plasmáticas a los 21 días respecto de los grupos control y grupo antibiótico (Figura 4.24). Además, se observó una tendencia a menores niveles de trigliceridos y colesterol plasmático a los 21 días de vida en los animales del grupo tratado con levadura (Figura 4.26 y 4.27). A los 35 días de vida, esas diferencias se ven atenuadas, lo que no resulta sorprendente considerando que la intervención con levadura fue realizada solo los primeros días de vida. Estos resultados abren una interesante perspectiva acerca de explorar otros esquemas de administración con foco en la problemática del Síndrome metabólico.

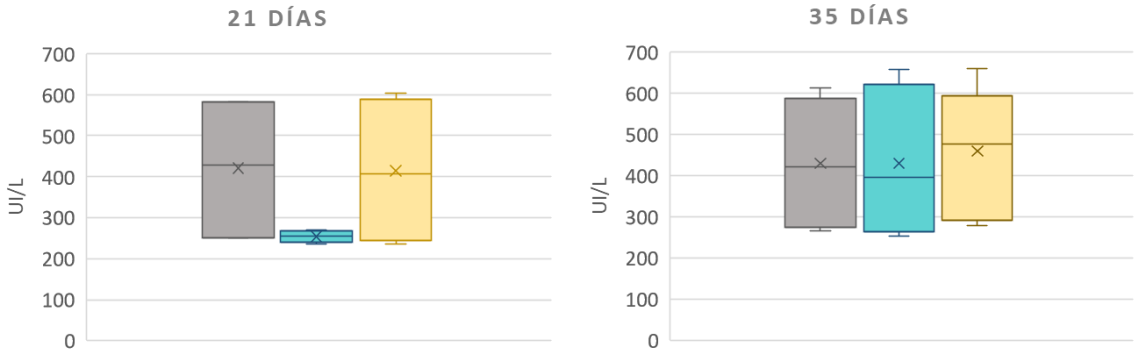


Figura 4.24: Niveles de transaminasa glutamico-oxalacética plamástica a los días 21 y 35 de vida. Se muestran los valores de las medias y desvió estandar por grupo en unidades internacionales/L de suero en grupo control (●); grupo levadura (●) y grupo BMD (●)

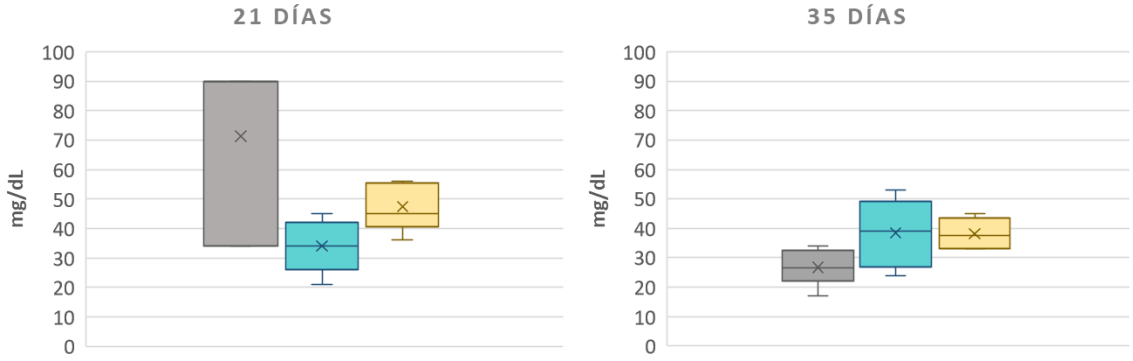


Figura 4.25: Trigliceridemia a los días 21 y 35 de vida. Se muestran los valores de las medias y desvió estandar en grupo control (●); grupo levadura (●) y grupo BMD (●).

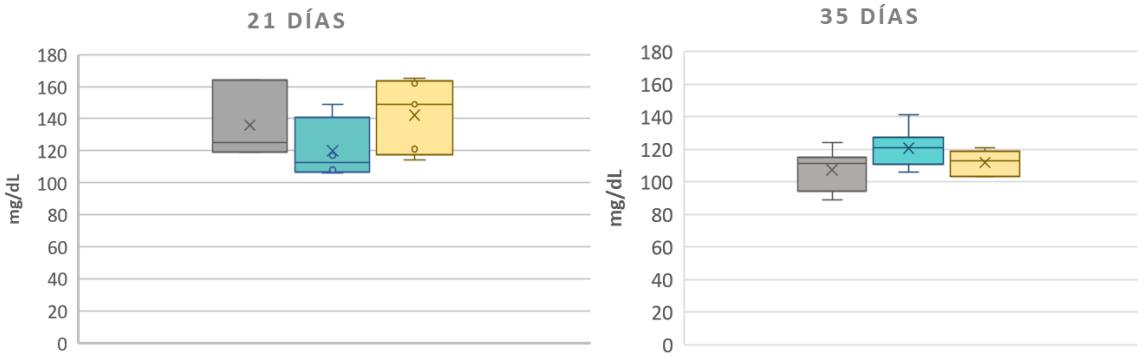


Figura 4.26: Colesterolemia a los días 21 y 35 de vida. Se muestran los valores de las medias y desvió estandar en grupo control (●); grupo levadura (●) y grupo BMD (●).

Con todo esto podemos concluir que la suplementación dietaria temprana con *K. marxianus* CIDCA 9121 a pollos de engorde mostró que esta levadura es inocua, y no causa efectos negativos en el desarrollo de los animales los cuales alcanzaron un peso final dentro de los valores normales esperados y comparables a los de los grupos control y suplementados con antibiótico como promotor de crecimiento. La mejora de la morfología intestinal, con aumento de longitud de vellosidades y profundidad de criptas, sugirió una mejor digestibilidad y capacidad de absorción de nutrientes intestinales y podría contribuir aún más a una mejora posterior en el rendimiento del crecimiento. Al mismo tiempo se evidenció una disminución en la vacuolización del tejido hepático, acompañado a los 21 días de vida de un descenso en los triglicéridos y colesterol plasmáticos en comparación a pollos que no recibieron la suplementación con levadura o recibieron BMD como promotor de crecimiento. Esto resultó en una contribución positiva al bienestar animal que a su vez se vio reflejado en un aumento en la conversión alimenticia para este grupo.

Todos estos resultados sugieren que la levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 con actividad probiótica representa una alternativa interesante para su utilización en el mejoramiento de parámetros productivos en reemplazo de antibióticos en la industria avícola.

CONLUSIONES

- ✓ La administración de levadura *K marxianus* CIDCA 9121 liofilizada 1,5x10^{10} UFC/cerda/día a cerdas durante los últimos 20 días de gestación y lactancia no mostró diferencias en los parámetros reproductivos de facilidad de parto, tamaño de camada y número de lechones nacidos vivos con respecto al grupo de cerdas no suplementadas.

- ✓ El dosaje de niveles de IgA en calostro no se vio afectado por la suplementación de levadura.

- ✓ Los lechones nacidos de cerdas suplementadas registraron un peso significativamente mayor que el grupo de lechones nacidos de cerdas control. Luego, la evolución de pesos hasta el destete fue similar en ambos grupos alcanzado un promedio de 6Kg.

- ✓ La suplementación con levadura liofilizada, 1x10^{9} UFC/lechón/día desde el destete y durante 21 días en recría, mejoró el rendimiento productivo de los lechones con una ganancia de 200 kilos vivo en el grupo levadura con respecto al grupo control.

- ✓ Los lechones suplementados, mostraron un mejor perfil de citrulina y aminoácidos séricos que evidencian un menor impacto del estrés al destete sobre la mucosa intestinal.

- ✓ La suplementación diaria con 1x10^{9}UFC *K. marxianus* CIDCA 9121 fresca a pollos de engorde durante los primeros 7 días de vida tuvo un impacto positivo en la conversión de alimento a biomasa, con valores inferiores al obtenido en pollo suplementados con antibiótico promotor de crecimiento usado habitualmente.

- ✓ La suplementación temprana con levaduras mostró un efecto positivo sobre el desarrollo y conformación del epitelio intestinal y una mejoría en el tamaño de vellosidades y criptas en intestino delgado en comparación a lo observado para pollos que no recibieron la suplementación.

- ✓ Los pollos que consumieron *K. marxianus* CIDCA 9121 presentaron a los 21 días de vida una disminución de la vacuolización del tejido hepático acompañada de una menor concentración de transaminasas, triglicéridos y colesterol plasmáticos.

- ✓ Todos estos resultados en conjunto indican que la suplementación con *K. marxianus* CIDCA 9121 es una intervención con un gran potencial de aplicación en producción porcina y aviar.

CONCLUSIONES GENERALES

Este trabajo de tesis se centró en establecer la prueba de concepto de un modelo de biorrefinería cuyo sustrato es un subproducto de la industria alimentaria, teniendo como fin último la generación de productos de mayor valor agregado contribuyendo a la transición de modelos de producción lineales a circulares y disminuyendo la contaminación ambiental. Se tuvo como meta el desarrollo de una tecnología que pueda ser atractiva para una transferencia al sistema productivo, por esto a lo largo del trabajo fuimos tomando algunas decisiones críticas para cumplir con esta premisa. Con respecto a la selección de los sustratos iniciales de trabajo, tanto la melaza de caña de azúcar proveniente de los ingenios como el suero de quesería proveniente de la industria láctea constituyen dos subproductos alimentarios altamente contaminantes debido principalmente a su composición química y los grandes volúmenes que se generan a diario. Atendiendo esta demanda de búsqueda de alternativas de valorización y también la reducción del uso de combustibles fósiles, se diseñó un proceso de biorrefinería que consistió en el empleo de levaduras *Kluyveromyces marxianus* para la obtención de etanol combustible y biomasa probiótica a partir de melaza o lactosuero. Las levaduras son microorganismos ampliamente empleados en diferentes procesos industriales que abarcan un gran espectro del mercado, desde producción de alimentos, pasando por diferentes productos farmacéuticos y compuestos químicos diversos. Dentro de las levaduras no-*Saccharomyces, Kluyveromyces marxianus* presenta ciertas características como altas tasas de crecimiento en diversos sustratos entre ellos lactosa y termotolerancia (Nurcholis et al., 2020; Bilal et al., 2022). Esta capacidad dual de *K. marxianus* de poseer excelentes cualidades para aplicación biotecnológica a gran escala fermentando diferentes sustratos y, además, su condición de microorganismo GRAS aceptado para consumo humano por la EFSA y la FDA y la reciente caracterización de ciertas cepas de esta especie como microorganismo probiótico, posicionan a esta especie como candidata muy atractiva para desarrollos tecnológicos.

Teniendo esto en cuenta, el punto de partida de este trabajo fue la selección de cepas capaces de crecer en los dos subproductos identificados al inicio. El enfoque del *screening* estuvo marcado por el trabajo en colaboración con el Dr. Andreas Gombert quien tiene vasta experiencia en la caracterización de cepas *K. marxianus* en condiciones de cultivo utilizadas en biorrefinerías productoras de etanol a partir de melaza de caña y levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Fonseca et al., 2013; Bermejo et al., 2020). Partiendo de un total de 30 cepas disponibles se seleccionaron *K. marxianus* CIDCA 81111, CIDCA 9121, NCYC 2907 y NYCY 1427 por la capacidad de crecer bajo anaerobiosis, la tolerancia a pH bajo, la tolerancia a la alta temperatura y la tolerancia a etanol en medios agarizados a base de melaza o suero de quesería. Para el proceso de selección se tuvo en cuenta el crecimiento en ambos sustratos, melaza de

caña de azúcar y lactosuero. Posteriormente, para acciones siguientes y teniendo en cuenta la demanda de nuestra región geográfica, se decidió enfocar el análisis en el aprovechamiento de suero de quesería, aunque sin perder de vista que el mismo recorrido puede ser realizado más adelante para melaza. En este sentido, en Argentina se producen del orden de 10.000 millones de litros de leche por año, de los cuales aproximadamente el 40% se destina a producción de quesos, resultando en la generación anual de 4.000 millones de litros de lactosuero (Talamoni et al., 2023). Se estima que un 50% del mismo, mayoritariamente producido por PYMES y queserías artesanales, es destinado a la alimentación animal o directamente es vertido al ambiente sin pretratamiento. Un estudio económico realizado en el transcurso de esta tesis por nuestro grupo de trabajo identificó que la mayor pérdida de valor del lactosuero se da en empresas queseras que procesan menos de 50.000 litros de leche por día y carecen de estructuras para su procesamiento. Además, reveló que es factible trabajar en la asociatividad entre las mismas ya que no se ubican en zonas muy alejadas entre sí. Considerando que muchas usinas queseras se agrupan geográficamente en cuencas lecheras en regiones relativamente cercanas, la conformación de un clúster se presenta como una de las formas de organización industrial más virtuosas por su alta capacidad para coordinar recursos y facilitar la transmisión de conocimientos y aprendizajes por medio de la cooperación interfirmas. La formación de figuras asociativas como el Clúster, se utiliza como herramienta para el análisis de aquellos factores que permiten a una industria incorporar nuevos eslabones en su cadena productiva. Esta idea incluye un gran número de interrelaciones entre instituciones y empresas (del ámbito público o privado) que operan dentro de un mismo sector o en sectores relativamente afines y están localizadas en un territorio determinado el cual brinda las condiciones de proximidad favorables para el desarrollo de vínculos que contribuyan a incrementar la eficiencia colectiva. En efecto se pensó en la posibilidad de que la tecnología desarrollada en este trabajo pueda ser implementada en etapas, permitiendo manejar los flujos de inversión de acuerdo con las posibilidades del sector. El modelo que se propuso fue a partir de interacciones con asociaciones de productores para buscar en una primera etapa, la posibilidad de implementar un esquema de acopio de suero de pequeños productores en nodos que permitan su concentrado y transporte reduciendo costos operativos y con un alto impacto en la sustentabilidad ambiental. En este sentido, el trabajo conjunto con el Cluster Quesero de Tandil permitió validar la idea de que la tecnología de biorrefinería desarrollada en esta tesis puede adaptarse a una formación asociativa de este tipo brindando importantes ventajas, entre ellas, la posibilidad de que participen tanto micro, pequeñas, medianas como grandes empresas favoreciendo la competitividad y permitiendo sortear importantes limitaciones, entre ellas, la escala a partir de la cual el proyecto resultaría ser económicamente viable. En ese marco, para un mejor aprovechamiento de los componentes

del lactosuero, se ajustó la idea de biorrefinería original con un nuevo modelo (Figura A) donde se planteó el concepto de una biorrefinería para la obtención de 3 productos de mayor valor agregado: concentrado proteico, etanol combustible y biomasa probiótica de levadura a partir de suero de quesería utilizando levaduras *K. marxianus.* De esta manera, la separación inicial de las proteínas por ultracentrifugación del lactosuero, permiten la obtención de un líquido remanente que contiene prácticamente toda la lactosa del mismo y puede ser utilizado como sustrato dentro de un biorreactor ubicado en la misma planta, donde se fermenta utilizando una cepa de la levadura *Kluyveromyces marxianus* con la consecuente producción de biomasa y etanol. La tecnología de separación de proteínas del lactosuero para su posterior comercialización como concentrados proteicos está ampliamente desarrollada en la actualidad (Yadav et al., 2015), por lo que nuestro trabajo se orientó exclusivamente a las alternativas de aprovechamiento del permeado de lactosuero.

Para poder evaluar la factibilidad de la puesta en marcha de la biorrefinería anteriormente descripta, las cuatro cepas seleccionadas en el *screening* inicial fueron posteriormente caracterizadas según su desempeño de producción de etanol en un sistema miniaturizado que simula la producción de etanol de 1G con ciclos consecutivos de fermentación y reciclado de células entre ciclos, teniendo en cuenta el rendimiento de etanol y la viabilidad de la levadura al final del proceso (Raghavendran et al., 2017). De las 4 cepas analizadas, *K. marxianus* CIDCA 9121 no solo mostró alta eficiencia en la metabolización de lactosa a etanol, sino que también presentó la mejor estabilidad ciclo a ciclo. Posteriormente, en vistas de la obtención de un producto probiótico al final del proceso, se evaluaron las propiedades funcionales de la biomasa remanente del proceso de fermentación. La potencialidad probiótica de la cepa *K marxianus* CIDCA 9121 aislada de gránulos de kefir de agua había sido descripta en nuestro grupo (Diosma et al., 2014; Romanin et al., 2010). No obstante, los nutrientes presentes en el medio de cultivo, así como las condiciones de crecimiento pueden modificar la expresión de proteínas de superficie y producción de metabolitos, por lo que también podría verse afectada la capacidad probiótica (Foligné et al.; 2016; Fiocco et al., 2020). Debido a ello, se evaluó cuidadosamente el efecto del sustrato sobre las propiedades probióticas de la cepa original. Los principales mecanismos de acción de los probióticos descriptos en bibliografía, incluyen la colonización y modulación de comunidades microbianas intestinales, exclusión competitiva de patógenos y producción de bacteriocinas, modulación de las actividades enzimáticas fecales asociadas con la metabolización de sales biliares y la inactivación de carcinógenos y otros xenobióticos, producción de ácidos grasos de cadena corta, adhesión a células intestinales y mucina, modulación del sistema inmunológico que resulta principalmente en la diferenciación de células

T reguladoras y la regulación positiva de citoquinas antiinflamatorias y factores de crecimiento e interacción con el eje cerebro-intestino mediante la regulación de funciones endocrinas (Plaza-Diaz et al., 2019). Muchas de estas propiedades dependen de la expresión de distintas biomoléculas que se pueden ver afectadas por las condiciones y sustrato empleados para el crecimiento del microorganismo probiótico (Liu et al., 2014; Rao et al., 2021). En esta tesis se demostró que *K. marxianus* CIDCA 9121 crecida en permeado de lactosuero sobrevive a las condiciones del tracto gastrointestinal *in vitro* e *in vivo*, presenta capacidad moduladora de la respuesta inmune innata de epitelio intestinal *in vitro* y actividad antiinflamatoria en un modelo animal de inflamación intestinal aguda, luego de ser sometida a un proceso industrial simulado. Además, antagoniza la invasión de *Salmonella entérica* serovar Enteritidis a células Caco-2 en cultivo, acción en la que probablemente las capacidades de autoagregación y adhesión al epitelio intestinal estén involucradas. Estos resultados en su conjunto permitieron establecer la prueba de concepto de la implementación de un modelo de biorrefinería como el planteado en la Figura A, su posterior patentamiento y avance en el licenciamiento de la tecnología.

Simultáneamente en el grupo de trabajo, se realizó un análisis económico con un modelo de negocios para cada producto y la implementación de una planta industrial que acopie suero proveniente de PyMEs queseras y a partir del cual se obtengan: concentrado proteico WPC35 (Whey Protein Concentrated 35%), etanol mediante la fermentación del permeado de suero remanente con *Kluyveromyces marxianus* y biomasa de levadura probiótica. El análisis llevado a cabo bajo la herramienta *Bussines Model Canvas*, concluyó que la producción de concentrados proteicos y en especial el de WPC35 constituye un modelo de negocios consolidado, con una posición de desarrollo favorable respecto al bioetanol (Zubillaga, 2022). En este sentido, la concentración de etanol alcanzada al final del proceso resultó bajo con respecto a los valores que hacen al proceso económicamente rentable, quedando aún por estudiar diferentes estrategias que permitan aumentar este rendimiento. En consecuencia, se avanzó hacia la optimización de un proceso que permitiera la producción de levadura probiótica a partir de lactosuero. En este aspecto, las condiciones de cultivo se modificaron para maximizar la producción de biomasa, lo que implicó trabajar en nuevas condiciones. Se validó así, la producción de biomasa de levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 en un biorreactor de 5L y posteriormente en un biorreactor de 15L, en condiciones de agitación y aireación a 30°C mediante un proceso llevado a cabo en un cultivo batch y un cultivo batch alimentado en un medio industrial a base de permeado de lactosuero adicionado de sulfato de amonio e hidrolizado de levaduras como fuente de nitrógeno y factores de crecimiento, respectivamente. Se verificó que la biomasa de levadura húmeda obtenida en estas condiciones conserva su

capacidad inmunomoduladora a nivel intestinal. El siguiente desafío tendiente a la posibilidad de comercialización de la levadura probiótica fue encontrar metodologías de conservación que se adapten a las necesidades del mercado. Debido a la alta demanda de energía y alto costo en el transporte de productos refrigerados, las formulaciones probióticas concentradas utilizadas en la nutrición animal y consumidas por los humanos se presentan con mayor frecuencia en forma de biomasa seca en polvo (Wang & Zhong, 2024). Durante los procesos de deshidratación, los microorganismos están expuestos a diferentes tipos de estrés, entre ellos el estrés térmico, osmótico, oxidativo y el daño mecánico por formación de cristales de hielo que pueden resultar en daños irreversibles en la fisiológica y conducir a la pérdida de su actividad funcional (Ananta et al., 2005; Huang et al., 2017). Los mecanismos asociados al estrés del proceso de secado dependerán de la técnica utilizada, las condiciones y también de la susceptibilidad del microorganismo con el que se esté trabajando. Para reducir estos efectos nocivos, se plantean en la actualidad diferentes estrategias que pueden comprender la selección de los parámetros más adecuados del proceso, adaptación del microorganismo a los factores de estrés previo al secado y la utilización de sustancias protectoras, entre otras (Ermis, 2022). En este trabajo se exploraron tres tecnologías de deshidratación: el secado spray, la extrusión y peletizado, y la liofilización. El producto obtenido por secado spray alcanzó un recuento de 10^7 UFC/g de levadura en polvo utilizando permeado de lactosuero como agente termoprotector. La extrusión y peletizado, ampliamente utilizado en la nutrición animal, afectó más drásticamente la viabilidad de la levadura durante el proceso y en consecuencia, se aplicó un diseño estadístico que permitió la selección de sacarosa, maltosa y maltodextrina como agentes termoprotectores. Aun así, el producto extrusado obtenido mostró una concentración de 1,9 x10^4 UFC/g levaduras viables, en el mejor de los casos. Cabe destacar que, la levadura extrusada conservó su actividad modulatoria de la respuesta inmune innata intestinal *in vitro* al final del proceso. La liofilización fue la tecnología de secado que mostró un mejor rendimiento en la viabilidad de levadura recuperada con una concentración máxima de 5,5 x10^9 UFC/g lactosuero como agentes protectores y fue seleccionada para la obtención de levadura probiótica deshidratada a escala piloto.

Numerosas levaduras y productos que contienen levadura se producen, comercializan y utilizan en la alimentación animal como proveedores de fuentes de probióticos y compuestos que cumplen distintas funciones nutricionales (Pang et al., 2022). El uso intensivo de antibióticos como agentes promotores del crecimiento en producción animal ha resultado en la propagación de la resistencia a los antibióticos con consecuencias para la salud animal y humana (Thompsonet al., 2023). En base a esta premisa y la importancia de explorar un enfoque

alternativo para prevenir enfermedades infecciosas y promover el crecimiento y la salud de los animales de producción se estudió el efecto de la suplementación con levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 en cerdos y aves de corral. Estos dos modelos animales enfrentan desafíos de producción bien diferentes. Por un lado, en la crianza de cerdos, se hace foco en la disminución de pérdidas de rendimiento causadas por el estrés que sufren los lechones al destete. Por otra parte, en la producción de pollos parrilleros, el cambio drástico de alimentación que se produce a las pocas horas de nacimiento, la alta tasa de conversión de alimento en masa muscular con la consecuente afectación de la salud intestinal y absorción de nutrientes son las principales causas de pérdidas de rendimiento. Sin embargo, estos modelos de animales monogástricos presentan una variable en común, y radica en que el deterioro de la salud intestinal se traduce en una mayor predisposición de los animales a las infecciones por agentes patógenos oportunistas y una consecuente pérdida de rendimiento en la ganancia de peso (Bikker & Jansman, 2023). Para evitar esto, es práctica habitual el uso de antibióticos como promotores de crecimiento, lo cual mejora el rendimiento, pero tiene como consecuencia la generación de resistencia a los antibióticos con tremendo impacto en salud humana y animal a futuro. La legislación actual en muchos países tiende a prohibir y sancionar estas prácticas siendo urgente la búsqueda de alternativas. En los estudios llevados a cabo en esta Tesis, la administración de levadura *K marxianus* CIDCA 9121 liofilizada cerdas gestantes y sus lechones no mostró diferencias en los parámetros reproductivos de las cerdas, pero si una mejora en el rendimiento productivo de sus lechones que tuvieron una ganancia de peso de alrededor del 10% mayor que la del grupo control. Además, los lechones suplementados con levadura mostraron un mejor perfil de citrulina y aminoácidos séricos que se relacionaron con un menor impacto del estrés al destete sobre la mucosa intestinal. Por otra parte, la suplementación temprana con *K. marxianus* CIDCA 9121 a pollos de engorde tuvo un impacto positivo en la conversión de alimento a biomasa, con valores inferiores al obtenido en pollos suplementados con antibiótico promotor de crecimiento usado habitualmente. Además, se observó un efecto positivo sobre el desarrollo y conformación del epitelio intestinal con una mejoría en el tamaño de vellosidades y criptas en intestino delgado en comparación a lo observado para pollos que no recibieron suplementación con levadura. Los estudios histológicos revelaron además una disminución de la vacuolización del tejido hepático en pollos suplementados, resultado que invita a profundizar sobre el impacto que pueda tener la suplementación temprana con levadura en otros escenarios de relevancia en este tipo de producciones como la miopatía asociada a síndrome metabólico en producción aviar (Boerboom et al., 2022), ampliando el espectro de aplicaciones del probiótico propuesto.

Las propiedades funcionales de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 9121 crecida en permeado de lactosuero documentadas en este trabajo en modelos celulares *in vitro* e *in vivo*, abarcando desde animales de laboratorio hasta animales de producción, reafirman la seguridad y potencialidad probiótica de *K. marxianus* CIDCA 9121 para su administración a humanos.

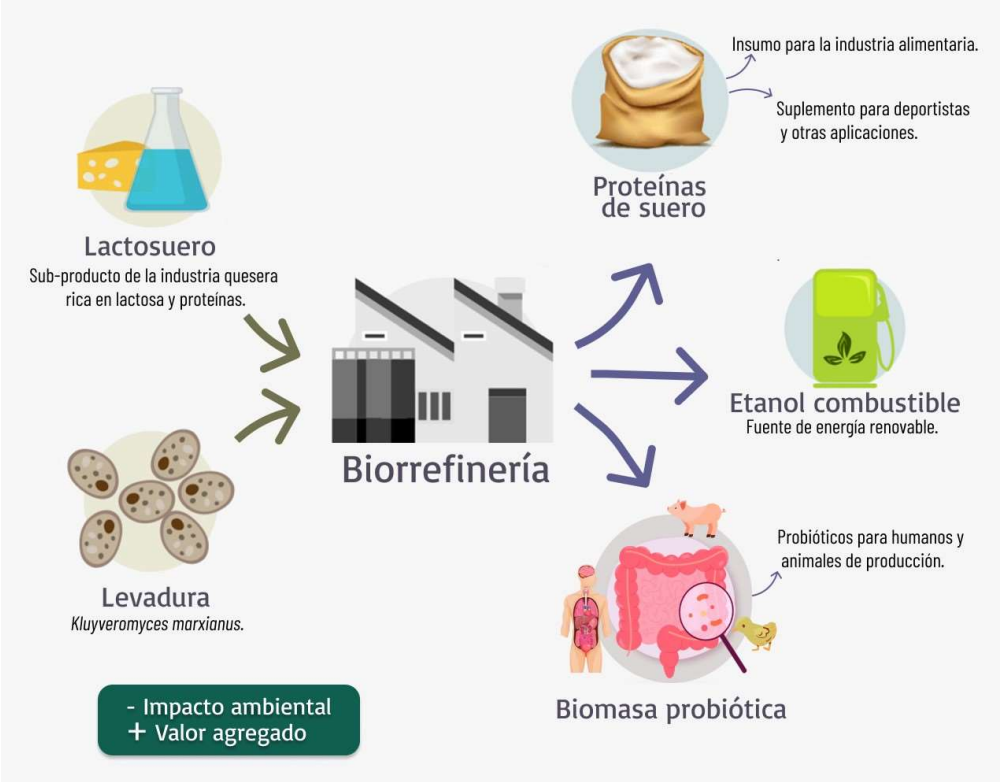


Figura A: Biorrefinería para el procesamiento de lactosuero.

Conclusión y perspectivas

Los resultados presentados a lo largo de este trabajo de tesis proponen una alternativa al aprovechamiento del suero de quesería, que no apuesta a atender a la demanda total del volumen producido a diario sino más bien a complementar las estrategias de revalorización ya existentes. El concepto de biorrefinería propuesto, utilizando la levadura *Kluyveromyces marxianu*s presenta robustez y versatilidad para la obtención de dos productos comerciales como el bioetanol y la biomasa probiótica para su aplicación en animales de producción y en humanos.

En particular, el recorrido realizado contribuye al estudio de aplicaciones biotecnológicas de levaduras no-*Saccharomyces* con la impronta novedosa de tratarse de una *K. marxianus* aislada de gránulos de kefir. Los resultados obtenidos impulsan la continuidad de los estudios en búsqueda de otras áreas de aplicación, así como la formulación de nuevos productos funcionales que incluyan esta levadura probiótica.

ANEXO

1. Medios de cultivo

Caldo YPD

Componente	Concentración (g/l)
Extracto de levadura	10
Peptona	20
Glucosa	20

Agar YGC (Merck, Alemania)

Componente	Concentración (g/l)
Extracto de levadura	5
Cloranfenicol	0,1
Glucosa	20
Agar	15
pH 6,5	

Agar YPLC

Componente	Concentración (g/l)
Extracto de levadura	5
Cloranfenicol	0,1
Lactosa	20
Púrpura de bromocresol	0,2
Agar	15
pH 7 ±0,5	

Agar MRS (Biokar Diagnostics, Francia)

Componente	Concentración (g/l)
Peptona	10
Extacto de carne	10
Extracto de levadura	5
D-glucosa	20
K2PHO4	2
Tween 80	1
Citrato ácido de amonio	2
Acetato de sodio	5

MgSO4	0,1
MnSO4	0,05
Agar	15
pH 6,5	

Agar MacConkey N°3 (Oxoid -Thermo Scientific)

Componente	**Concentración (g/l)**
Peptona de gelatina	17
Peptona de caseína	1,5
Peptona de carne	1,5
Lactosa	10
Sales biliares	1,5
NaCl	5
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,001
Agar	13,5
pH 7,1±0,2	

Agar nutritivo (Biokar Diagnostic, Francia)

Componente	**Concentración (g/l)**
Extracto de carne	3
Peptona	5
Agar	15
pH 7	

Agar Bilis Esculina con Azida (Biokar Diagnostic, Francia)

Componente	**Concentración (g/l)**
Azida sódica	0,15
Bilis de buey	10
Citrato de hierro y amonio	0,5
Cloruro de sodio	5
Esculina	1
Extracto de carne	5
Proteosa peptona N°3	3
Tripteína	17
Agar	15
pH 7,1±0,2	

Agar TSC (Tryptone-Sulfite-Cycloserine)

Componente	Concentración (g/l)
Triptosa	15
Peptona de Soja	5
Extracto de levadura	5
Citrato amonio férrico	1
Disulfito de sodio	1
Agar	19
pH 7	

A la composición descripta se resuspendió en agua y se esterilizó con vapor de agua a 121°C. previo a la distribución en placas de Petri, el medio se fundió, se dejó enfriar a 50°C y se adicionó 25 ml de emulsión de yema de huevo (SR0047) y el contenido rehidratado de un vial de suplemento TSC (SR0088) o suplemento SFP (SR0093).

Agar melaza de caña de azúcar

Componente	Concentración (g/l)
Melaza	20
Agar	15
pH 7±0,5	

La melaza de caña utilizada fue donada por biorrefinería productora de bioetanol en Brasil. Se preparó una dilución al doble de concentración de melaza de caña de azúcar (400 g/L) en agua destilada. Se centrifugó a 5000g a 10°C por 10 min para separar sólidos. El sobrenadante se diluyó a la mitad con agua destilada y se esterilizó con vapor de agua a sobrepresión durante 15 minutos. El agar se adicionó en una suspensión estéril, de manera de alcanzar una concentración final en medio de 15 g/L.

Agar suero de quesería

Componente	Concentración (g/l)
Suero de quesería	100
Agar	15
pH 6±0,5	

El suero de quesería (VACALIN) proveniente de la elaboración del queso, previa pasteurización y parcial desmineralización y deshidratado por secado spray. El polvo se pesó y se resuspendió en agua destilada. Se esterilizó con vapor de agua a 121°C durante 15 minutos. En forma aséptica se separaron las proteínas coaguladas. Al líquido remanente se le adicionó una suspensión de agar estéril.

Agar permeado

Componente	**Concentración (g/l)**
Permeado de lactosuero	100
Agar	15
pH 6±0,5	

El permeado de lactosuero (ARLA Food Ingredients) deshidratado por secado spray, se pesó y se resuspendió en agua destilada. Se adicionó el agar bacteriológico y se esterilizó con vapor de agua a 121°C durante 15 minutos

Medio líquido a base de suero quesería (sistema miniaturizado de producción de etanol de 1G)

Componente	**Concentración (g/l)**
Suero de quesería	100
pH 6±0,5	

Solución fisiológica

Componente	**Concentración (g/l)**
NaCl	8,5

Buffer fosfato PBS

Componente	**Concentración (g/l)**
KH2PO4	0,14
NaCl	9
Na2HPO4	0,73
pH 7,2 ±0,2	

Solución T-PBS

Componente	Concentración (g/l)
KH2PO4	0,14
NaCl	9
Na2HPO4	0,73
Tween 20	0,5
pH 7,2 ±0,2	

Solución gástrica

Componente	Concentración
NaCl	125mM
KCl	7mM
NaHCO3	4mM
Pepsina	3 g/L
pH 2,5	

Solución intestinal

Componente	Concentración
Sales biliares	1,5 g/L
Pancreatina	1 g/L
NaCl	22mM
KCl	3,2mM
NaHCO3	7,6mM
pH 8	

Las soluciones gástrica e intestinal se prepararon pesando todos los componentes excepto las enzimas y sales biliares. Los componentes se resuspendieron en agua miliQ y se llevaron a pH utilizando HCL 5M o NaOH 5M según corresponda. Estas suspensiones se esterilizaron con vapor de agua a 121°C durante 15 min. Las enzimas (pepsina y pancreatina) y sales biliares (Sigma-Aldrich) no requieren esterilización, se pesaron y agregaron a las soluciones correspondientes al momento de realizar el ensayo.

2. Reactivo de Antrona

Para preparar el reactivo Antrona, se adicionó 82,5 ml de ácido sulfúrico 98 % sobre 42,5 ml de agua destilada y luego se disolvieron 0,0625 gr de Antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno). El reactivo se almacenó a 0 – 4°C durante no más de dos semanas.

3. Cultivo de células Caco-2/TC7

Las células Caco-2/TC7 son un clon de las células Caco-2 con mayor velocidad de diferenciación. Las células se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido en viales conteniendo 1 ml de medio DMEM completo (ver Apéndice) con 5 % de dimetilsulfóxido (Riedel-de Haën AG, D-3016 Seelze, Alemania) como crioprotector. Para reactivarlas se descongeló un vial a 37 °C, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min para retirar el crioprotector, las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo fresco en una botella de 25 cm^2 (Corning Costar Co., Cambridge, MA, USA) con 4 ml de medio DMEM completo. El cultivo se mantuvo a 37 °C en estufa con atmósfera controlada (5 % CO2 – 95 % aire) cambiando el medio cada 2 días. A los 7 días se obtuvo una monocapa confluente y se repicó a una botella de 75 cm^2. En cada repique la monocapa se observó en un microscopio invertido para verificar su uniformidad y continuidad. Los repiques se realizaron de la siguiente manera: se descartó el medio ya agotado y se lavó la monocapa dos veces con PBS estéril, luego se colocaron 10 ml de solución de tripsina (ver Anexo) y se llevó a la estufa a 37 °C durante 5 a 8 min. Cuando se observaron los primeros indicios de desprendimiento celular, se levantó la monocapa en 10 ml de DMEM para inactivar la enzima. Se centrifugó a baja velocidad durante 5 min, se descartó el medio y se reemplazó por medio DMEM fresco. Se tomaron 50 ml de la suspensión de células y se mezclaron con igual volumen de una solución de azul tripán al 10 % en PBS. Se realizó el recuento de células en una cámara de Neubauer contando sólo aquellas células brillantes (viables).

Se preparó una suspensión de 2,5 x 10^5 células/ml y se sembraron 0,5 ml por fosa en placas de 24 fosas (Corning Costar Co., Cambridge, MA, USA). Las placas con células Caco-2/TC7 se incubaron 7 días (células en confluencia) a 37 °C en una estufa de atmósfera controlada (5 % CO2 – 95 % aire) cambiando el medio cada 2 días.

4. Medios utilizados en cultivos celulares

DMEM base. Medio Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (Gibco BRL Life Technologies, USA)

Componente	Concentración
DMEM	1000 ml final
NaHPO3	2 g/L

pH 7,0 ±0,2

Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0,22µm

DMEM completo (Gibco BRL Life Technologies, USA)

Componente	Concentración
DMEM	1000 ml final
Suero fetal bovino inactivado	2 g/L
Aminoácidos no esenciales (GIBCO Life Technologies, USA)	13 ml
Penicilina/ Streptomicina (1000 IU/ml, 1000 µg/ml)	13ml
Gentamicina (50 mg/ml) (Parafarm, aporiti SACIFIA,	10 ml
NaHCO3	2 g

pH 7,0 ±0,2

El suero fetal bovino se inactiva 30 min a 60 °C. Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0,22 µm.

5. Preparación y tinción de cortes histológicos con Hematoxilina y Eosina

Los tejidos de los animales se fijaron en paraformaldehído al 10% y se deshidrataron en un tren de deshidratación que incluyó 3 incubaciones de 10 min en etanol (50%, 70% y 100%) y dos incubaciones en Xilol al 100%. El tejido se incluyó luego en parafina fundida a 60 °C, se tomaron secciones de 7-10 µm de espesor utilizando un micrótomo, se fijaron en un portaobjetos con calor y se eliminaron los restos de parafina lavando con xilol. Se rehidrataron los preparados utilizando el tren de deshidratación en sentido inverso. Los preparados, lavados con agua destilada para eliminar los restos de etanol, se sumergieron durante 10 min en una preparación de hematoxilina, se lavaron con etanol y luego con agua destilada hasta eliminar los restos del colorante. Luego se sumergieron los preparados en eosina durante 30 seg y se enjuagaron con agua destilada. Se deshidrataron nuevamente los preparados y se dejaron 10 min en xilol. Finalmente, se secaron y se montaron los cubreobjetos con resina de montaje.

BIBLIOGRAFÍA

Alex, P., Zachos, N. C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T. E., Conklin, L. S., ... & Li, X. (2009). Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflammatory Bowel Diseases,* 15(3), 341-352.

Aliyi, M. B. (2023). Review on application of probiotics in poultry farm. *International Journal of Probiotics and Dietetics*, 3(2), 58-65.

Allameh, A., Safamehr, A., Mirhadi, S. A., Shivazad, M., Razzaghi-Abyaneh, M., & Afshar-Naderi, A. (2005). Evaluation of biochemical and production parameters of broiler chicks fed ammonia treated aflatoxin contaminated maize grains. *Animal Feed Science and Technology*, 122(3-4), 289-301.

Alonso, L. L., Podio, N. S., Marino, D. J. G., Almada, N. S., Gange, J. M., Bernigaud, I., Mórtola, N., & Wunderlin, D. A. (2024). Evaluating antibiotic occurrence, degradation, and environmental risks in poultry litter within Argentina's agricultural hub. *The Science of the Total Environment*, 920.

Al-Otaibi, A. M., Abd El-Hack, M. E., Dmour, S. M., Alsowayeh, N., Khafaga, A. F., Ashour, E. A., ... & Świątkiewicz, S. (2023). A narrative review on the beneficial impacts of probiotics on poultry: an updated knowledge. *Annals of Animal Science*, 23(2), 405-418.

Álvarez-Cao, M. E., Becerra, M., & González-Siso, M. I. (2020). Biovalorization of cheese whey and molasses wastes to galactosidases by recombinant yeasts. In Biovalorisation of wastes to renewable chemicals and biofuels (pp. 149-161). Elsevier.

Amin, S. A. S., & Sobhi, N. (2023). Process optimization in poultry feed mill. *Scientific Reports*, 13(1), 9897.

Ananta, E., Volkert, M., & Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, 15(4), 399-409.

Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., & Topuz, A. (2015). Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, *63*(1), 685-690.

Basso, L. C., De Amorim, H. V., De Oliveira, A. J., & Lopes, M. L. (2008). Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1155-1163.

Bellaver, L. H., de Carvalho, N. M. B., Abrahão-Neto, J., & Gombert, A. K. (2004). Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. *FEMS Yeast Research*, 4(7), 691-698.

Bengoa, A. A., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2020). Kefir y los alimentos fermentados artesanales. En Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura; Ferrari, Vinderola & Weill Eds. Instituto Danone; 135-164.

Beniwal, A., Saini, P., Kokkiligadda, A., Vij, S., 2018. Use of silicon dioxide nanoparticles for β-galactosidase immobilization and modulated ethanol production by co-immobilized *K. marxianus* and *S. cerevisiae* in deproteinized cheese whey. *LWT-Food Science and Technology,* 87, 553–561.

Berkeveld, M., Langendijk, P., Verheijden, J. H. M., Taverne, M. A. M., Van Nes, A., Van Haard, P., & Koets, A. P. (2008). Citrulline and intestinal fatty acid-binding protein: Longitudinal markers of postweaning small intestinal function in pigs? *Journal of Animal Science*, 86(12), 3440-3449.

Bermejo PM, Raghavendran V & Gombert AK (2020). Neither 1G nor 2G fuel ethanol: setting the ground for a sugarcane-based biorefinery using an iSUCCELL yeast platform. *FEMS Yeast Research*, 1;20(4):foaa027.

Bhagwat, A., Bhushette, P. & Annapure, U. S. (2020). Spray drying studies of probiotic *Enterococcus* strains encapsulated with whey protein and maltodextrin. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 9(1), 1–8.

Bikker P & Jansman AJM. (2023). Review: Composition and utilisation of feed by monogastric animals in the context of circular food production systems. *Animal.* 2023 Jul;17 Suppl 3:100892.

Bilal, M., Ji, L., Xu, Y., Xu, S., Lin, Y., Iqbal, H. M. & Cheng, H. (2022). Bioprospecting *Kluyveromyces marxianus* as a robust host for industrial biotechnology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 851768.

Boerboom GM, Navarro-Villa A & van Kempen TATG. (2022). Metabolomic Analysis of Wooden Breast Myopathy Shows a Disturbed Lipid Metabolism. *Metabolites*, 13(1):20.

Bordonal, R. D. O., Carvalho, J. L. N., Lal, R., De Figueiredo, E. B., De Oliveira, B. G. & La Scala, N. (2018). Sustainability of sugarcane production in Brazil. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 38, 1-23.

Braber, N. V., Vergara, L. D., Rossi, Y. E., Aminahuel, C. A., Mauri, A. N., Cavaglieri, L. R. & Montenegro, M. A. (2020). Effect of microencapsulation in whey protein and water-soluble chitosan derivative on the viability of the probiotic *Kluyveromyces marxianus* VM004 during storage and in simulated gastrointestinal conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 118, 108844.

Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Claes, I. J., Lebeer, S. & 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.

Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Henkens, T., Kiekens, S., van den Broek, M. F., Lebeer, S. & Kiekens, F. (2017). Enhancing the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG after spray drying and during storage. *International Journal of Pharmaceutics*, 534(1–2), 35–41.

Brugaletta, G., Teyssier, J. R., Rochell, S. J., Dridi, S. & Sirri, F. (2022). A review of heat stress in chickens. Part I: Insights into physiology and gut health. *Frontiers in Physiology*, 13.

Campabadal, C. & Navarro, H. (1994). Manejo y alimentación del lechón pre y post destete. Asociación Americana de Soya. AN, 92, 21.

Cardoso Dal Pont, G., Farnell, M., Farnell, Y. & Kogut, M. H. (2020). Dietary Factors as Triggers of Low-Grade Chronic Intestinal Inflammation in Poultry. *Microorganisms*, 8(1).

Carrillo, G. & Ponce Sanchez, J.I. (2019). Economía circular, bioeconomía y biorrefinerías. Biorrefinerías y Economía Circular. Carrillo & Torres (coords.), 15-36. Universidad Autónoma Metropolitana.

Carvalho, P., Costa, C. E., Baptista, S. I. L. & Domingues, L. (2021). Yeast cell factories for sustainable whey-to-ethanol valorisation towards a circular economy. *Biofuel Research Journal,* 8(4), 1529-1549.

Casp Vanaclocha, A. & Abril Requena, J. (1999). Procesos de conservación de alimentos. Mundi-prensa libros. 84-89922-23-3, 84-7114-810-2.

Cassani L, Gomez-Zavaglia A. & Simal-Gandara J (2020). 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*, 129, Article 108852

Cerrutti, P., Segovia de Huergo, M., Galvagno, M., Schebor, C. & del Pilar Buera, M. (2000). Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 575-580.

Chávez, B. E. & Ledeboer, A. M. (2007). Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying technology*, 25(7-8), 1193-1201.

Chelliah, R., Kim, E. J., Daliri, E. B. M., Antony, U. & Oh, D. H. (2021). In vitro probiotic evaluation of *Saccharomyces boulardii* with antimicrobial spectrum in a *Caenorhabditis elegans* model. *Foods,* 10(6), 1428.

Código Alimentario Argentino (CAA) - Capitulo VIII, Artículo 582 – Resolución Conjunta RESFC-2018-18-APN-SRYGS#MSYDS Nº18/2018.

Código Alimentario Argentino (CAA) - Capitulo XVll, Artículo 1389 - Resolución conjunta SPReI N° 229/2011 y SAGyP N° 731/2011.

Contreras, C. N. H., Guerrero, R. J. P., Oré, J. E. H. & Alarcón, P. W. G. (2022). Producción de etanol a partir de melaza de caña de azúcar y diferentes cepas de levadura. *Revista Ciencia y Tecnología,* 18(3), 65-70.

Conway, E., O'Doherty, J. V., Mukhopadhya, A., Dowley, A., Vigors, S., Maher, S., ... & Sweeney, T. (2022). Maternal and/or direct supplementation with a combination of a casein hydrolysate and yeast β-glucan on post-weaning performance and intestinal health in the pig. *Plos one*, 17(7), e0265051.

Crespo, S. & Gadea, J. (2021). Relación entre el peso al nacimiento de los lechones de cerdas hiperprolíficas y los parámetros productivos y económicos en los cerdos de engorde. *Información Técnica Económica Agraria*, 117(2).

Curis, E., Nicolis, I., Moinard, C., Osowska, S., Zerrouk, N., Bénazeth, S. & Cynober, L. (2005). Almost all about citrulline in mammals. *Amino acids*, 29, 177-205.

De Souza, T. C. R., Landín, G. M., García, K. E., Barreyro, A. A. & Barrón, A. M. (2012). Nutritional changes in piglets and morphophysiologic development of their digestive tract. *Veterinaria México*, 43(2), 155-173.

Della-Bianca, B.E. & Gombert, A.K. (2013). Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 104:1083–1095

Deshmukh, N., Rao, P. S., Sharma, H. & Kumar, M. (2024). Waste to nutrition: The evolution of whey, a byproduct to galactooligosaccharides production. *Food Chemistry Advances*, 4, 100642.

Dhama, K., Mahendran, M., Tomar, S. & Chauhan, R. S. (2008). Beneficial effects of probiotics and prebiotics in livestock and poultry: the current perspectives. *Intas Polivet*, 9(1), 1-12.

Diosma, G., Romanin, D. E., Rey-Burusco, M. F., Londero, A. & Garrote, G. L. (2014). Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 30, 43-53.

Dittoe, D. K., Olson, E. G. & Ricke, S. C. (2022). Impact of the gastrointestinal microbiome and fermentation metabolites on broiler performance. *Poultry Science*, 101(5).

Domingos, R. L., Silva, B. A. N., De Laguna, F. B., Araujo, W. A. G., Gonçalves, M. F., Rebordões, F. I. G., ... & da Motta, S. A. B. (2021). *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079 during late gestation and lactation improves voluntary feed intake, milk production and litter performance of mixed-parity sows in a tropical humid climate. *Animal Feed Science and Technology*, 272, 114785.

Dos Santos, R. C. S., Finkler, L. & Finkler, C. L. L. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 31(8), 759-767.

EFSA Panel on Biological Hazards Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal* 2013; 11:3449

El-Sabrout, K., Khalifah, A. & Mishra, B. (2023). Application of botanical products as nutraceutical feed additives for improving poultry health and production. *Veterinary World*. 16, 369.

Ermis, E. (2022). A review of drying methods for improving the quality of probiotic powders and characterization. *Drying Technology*, 40(11), 2199-2216.

Értola, R., Yantorno, O. & Mignone, C. (2006). Microbiología industrial. OAS, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington, D. C.

Fadda, M. E., Mossa, V., Deplano, M., Pisano, M. B. & Cosentino, S. (2017). In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. *LWT-Food Science and Technology,* 75, 100-106.

Fages, S., Williams, S. & Valette, E. (2021). CAPÍTULO 6 Producción de lechones. Manual de producción porcina, 104.

Fasoli, G., Barrio, E., Tofalo, R., Suzzi, G. & Belloch, C. (2016). Multilocus analysis reveals large genetic diversity in *Kluyveromyces marxianus* strains isolated from Parmigiano Reggiano and Pecorino di Farindola cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 233, 1-10.

Fathima, S., Hakeem, W. G. Al, Shanmugasundaram, R. & Selvaraj, R. K. (2022). Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: A Review on the Pathogen, Pathogenesis, and Prevention. *Microorganisms,* 10(10).

Feldpausch, J. A., Jourquin, J., Bergstrom, J. R., Bargen, J. L., Bokenkroger, C. D., Davis, D. L., ... & Ritter, M. J. (2019). Birth weight threshold for identifying piglets at risk for preweaning mortality. *Translational Animal Science*, 3(2), 633-640.

Fernández-Pacheco, P., Pintado, C., Briones Pérez, A. & Arévalo-Villena, M. (2021). Potential probiotic strains of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces:* functional and biotechnological characteristics. *Journal of Fungi*, 7(3), 177.

Fiocco D, Longo A, Arena MP, Russo P, Spano G, Capozzi V. (2020) How probiotics face food stress: They get by with a little help. *Critical Reviews in Food Science and Nutrit*ion, 60(9):1552-1580

Fogh, J., Fogh, J. M. & Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 59(1), 221-226.

Foligné, B., Parayre, S., Cheddani, R., Famelart, M. H., Madec, M. N., Plé, C., ... & Deutsch, S. M. (2016). Immunomodulation properties of multi-species fermented milks. *Food Microbiology*, 53, 60-69.

Fonseca G.G., Heinzle E., Wittmann C. & Gombert A.K. (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 79:339–354.

Fonseca, G. G. (2022). Metabolic engineering of *Kluyveromyces marxianus* for biomass-based applications. *3 Biotech*, 12(10), 259.

Fonseca, G. G., de Carvalho, N. M. B. & Gombert, A. K. (2013). Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 5055-5067.

Fonseca, G. G., Gombert, A. K., Heinzle, E. & Wittmann, C. (2007). Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. *FEMS Yeast Research*, 7(3), 422-435.

Fredua-Agyeman, M. (2024). Surviving process and transit: Controlled freeze drying, storage and enteric coated capsules for targeted delivery of probiotic *Lactobacillus acidophilus. Heliyon*, 10(7).

Fu, J., Liu, J., Wen, X., Zhang, G., Cai, J., Qiao, Z., An Z., Zheng J. & Li, L. (2023). Unique probiotic properties and bioactive metabolites of *Saccharomyces boulardii*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15(4), 967-982.

Fu, N., & Chen, X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, 44(5), 1127-1149.

Gaggìa, F., Mattarelli, P. & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S15-S28.

Gaidhani, K. A., Harwalkar, M., Bhambere, D. & Nirgude, P. S. (2015). Lyophilization/freeze drying–a review. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(8), 516-543.

Gänzle, M. G., Haase, G. & Jelen, P. (2008). Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal*, 18(7), 685-694.

Gardiner, G. E., O'sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A. E., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., ... & 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), 2605-2612.

Garrote, G. L., Abraham, A. G. & De Antoni, G. L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68(4), 639-652.

Gil-Rodríguez, A. M., Carrascosa, A. V. & Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1156-1162.

Golowczyc, M. A., Silva, J., Abraham, A. G., De Antoni, G. L. & Teixeira, P. (2010). Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 7-12.

Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Garre, E. & Matallana, E. (2011). Recent advances in yeast biomass production. Biomass—Detection, production and usage, 202-222.

Grimoud, J., Durand, H., De Souza, S., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V. & Roques, C. (2010). In vitro screening of probiotics and synbiotics according to anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 42-50.

Grześkowiak, Ł., Isolauri, E., Salminen, S. & Gueimonde, M. (2011). Manufacturing process influences properties of probiotic bacteria. *British Journal of Nutrition*, 105(6), 887-894.

Guimarães, P. M., Teixeira, J. A. & Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28(3), 375-384.

Guo, H., Wang, P., Liu, C., Chang, J., Yin, Q., Wang, L., ... & Lu, F. (2023). Compound mycotoxin detoxifier alleviating aflatoxin B1 toxic effects on broiler growth performance, organ damage and gut microbiota. *Poultry Science*, 102(3), 102434.

Guowei, S., Yang, X., Li, C., Huang, D., Lei, Z. & He, C. (2019). Comprehensive optimization of composite cryoprotectant for *Saccharomyces boulardii* during freeze-drying and evaluation of its storage stability. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 49(9), 846-857.

Hasan, S., Junnikkala, S., Peltoniemi, O., Paulin, L., Lyyski, A., Vuorenmaa, J. & Oliviero, C. (2018). Dietary supplementation with yeast hydrolysate in pregnancy influences colostrum yield and gut microbiota of sows and piglets after birth. *PLoS One*, 13(5), e0197586.

Ha-Tran, D. M., Nguyen, T. T. M. & Huang, C. C. (2020). *Kluyveromyces marxianus*: Current state of omics studies, strain improvement strategy and potential industrial implementation. *Fermentation,* 6(4), 124.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Sanders, M. E. (2014). 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), 506-514.

Homayouni-Rad A., Azizi A., Oroojzadeh P. & Pourjafar H. (2020). *Kluyveromyces marxianus* as a probiotic yeast: A mini-review. *Current Nutrition & Food Science* 16.8: 1163-1169.

Horaczek, A., & Viernstein, H. (2004). Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae. Biological Control*, 31(1), 65-71.

Huang, S., Vignolles, M. L., Chen, X. D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P. & Jeantet, R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology,* 63, 1-17.

Ianiro, G., Bruno, G., Lopetuso, L., Bartoli Beghella, F., Laterza, L., D'Aversa, F., ... & Gasbarrini, A. (2014). Role of yeasts in healthy and impaired gut microbiota: the gut mycome. *Current Pharmaceutical Design*, 20(28), 4565-4569.

Inoue, R. & Tsukahara, T. (2021). Composition and physiological functions of the porcine colostrum. *Animal Science Journal,* 92(1), e13618.

Ishtar Snoek, I. S. & Yde Steensma, H. (2006). Why does *Kluyveromyces lactis* not grow under anaerobic conditions? Comparison of essential anaerobic genes of *Saccharomyces cerevisiae* with the *Kluyveromyces lactis* genome. *FEMS Yeast Research*, 6(3), 393-403.

Jacobsen, N. M. Y., Caglayan, I., Caglayan, A., Bar-Shalom, D. & Müllertz, A. (2020). Achieving delayed release of freeze-dried probiotic strains by extrusion, spheronization and fluid bed coating-evaluated using a three-step in vitro model. *International Journal of Pharmaceutics*, 591, 120022.

Jang, Y. D., Kang, K. W., Piao, L. G., Jeong, T. S., Auclair, E., Jonvel, S., ... & Kim, Y. Y. (2013). Effects of live yeast supplementation to gestation and lactation diets on reproductive performance, immunological parameters and milk composition in sows. *Livestock Science*, 152(2-3), 167-173.

Jankowska, A., Laubitz, D., Antushevich, H., Zabielski, R. & Grzesiuk, E. (2008). Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2008.

Johnson, J. A. C. & Etzel, M. R. (1995). Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 attenuated by spray-drying, freeze-drying, or freezing. *Journal of Dairy Science*, 78(4), 761-768.

Joint, F. A. O. (2002). WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canadá, 30(1), 16-22.

Juliano, P.; Muset, G.; Castells, M. L. (2017) Valorización del lactosuero. San Martín: Instituto Nacional de Tecnología Industrial, INTI. ISBN 978-950-532-341-8.

Karim, A., Gerliani, N. & Aïder, M. (2020). *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108818.

Kelesidis, T. & Pothoulakis, C. (2012). Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 5(2), 111-125.

Kiepś, J. & Dembczyński, R. (2022). Current trends in the production of probiotic formulations. *Foods,* 11(15), 2330.

Kim, W.H. & Lillehoj, H.S. (2019) Immunity, immunomodulation, and antibiotic alternatives to maximize the genetic potential of poultry for growth and disease response. *Animal Feed Science and Technology,* 250, 41–50.

Kober, A. H., Riaz Rajoka, M. S., Mehwish, H. M., Villena, J. & Kitazawa, H. (2022). Immunomodulation potential of probiotics: a novel strategy for improving livestock health, immunity, and productivity. *Microorganisms,* 10(2), 388.

Kopsahelis, N., Bosnea, L., Bekatorou, A., Tzia, C. & Kanellaki, M. (2012). Alcohol production from sterilized and non-sterilized molasses by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on brewer's spent grains in two types of continuous bioreactor systems. *Biomas and Bioenergy*, 45, 87-94.

Koushki, M., Jafari, M. & Azizi, M. (2012). Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. *Journal of Food Science and Technology*, 49, 614-619.

Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T. & Shimazaki, K. (2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of Dairy Science*, 87(12), 4050-4056.

Kwak, H. S. (2014). Overview of nano-and microencapsulation for foods. *Nano-and Microencapsulation for Foods*, 1-14.

Lagrange, V. & Clark, D. C. (2019). Nutritive and therapeutic aspects of whey proteins. In Whey Proteins (pp. 549-577). Academic Press.

Lane M.M, Burke N., Karreman R., Wolfe K.H, O'Byrne C.P. & Morrissey J.P. (2011). Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of Geneneral Molecular Microbiology,* 100:507–519.

Lauric, M. A., Torres Carbonell, C. A. & De Leo, G. (2021). Utilización de suplementación líquida (melaza) para el ganado bovino en el sudoeste de provincia de Buenos Aires, Argentina. Relevamiento de casos reales. Estación Experimental Agropecuaria Bordenave, INTA. http://hdl.handle.net/20.500.12123/9780

Lee, Y.K. (2009). Selection and maintenance of probiotic microorganisms. In Handbook of Probiotics and Prebiotics; Lee, Y.K., Salminen, S., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 177–187.

Lertwattanasakul, N., Kosaka, T., Hosoyama, A., Suzuki, Y., Rodrussamee, N., Matsutani, M., ... & Yamada, M. (2015). Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnology for Biofuels*, 8, 1-14.

Li, Y., Sadiq, F. A., Liu, T., Chen, J. & He, G. (2015). Purification and identification of novel peptides with inhibitory effect against angiotensin I-converting enzyme and optimization of process conditions in milk fermented with the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Functional Foods*, 16, 278-288.

Lin, J., Comi, M., Vera, P., Alessandro, A., Qiu, K., Wang, J., ... & Zhang, H. J. (2023). Effects of *Saccharomyces cerevisiae* hydrolysate on growth performance, immunity function, and intestinal health in broilers. *Poultry Science*, 102(1), 102237.

Liu XT, Hou CL, Zhang J, Zeng XF, Qiao SY. (2014). Fermentation conditions influence the fatty acid composition of the membranes of *Lactobacillus reuteri* I5007 and its survival following freeze-drying. *Letters in Applied Microbiology,* 59(4):398-403.

Liu, Y., Huang, J., Hou, Y., Zhu, H., Zhao, S., Ding, B., ... & Fan, W. (2008). Dietary arginine supplementation alleviates intestinal mucosal disruption induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in weaned pigs. *British Journal of Nutrition*, 100(3), 552-560.

Lodder, J. & Kreger-van Rij, N. J. W. (1952). The yeasts, a taxonomic study. North-Holland Publishing Company.

Londero, A., Hamet, M. F., De Antoni, G. L., Garrote, G. L. & Abraham, A. G. (2012). Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterisation. *Journal of Dairy Research*, 79(3), 262-271.

Lukondeh, T., Ashbolt, N. J. & Rogers, P. L. (2005). Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,* 32(7), 284-288.

Maccaferri, S., Klinder, A., Brigidi, P., Cavina, P. & Costabile, A. (2012). Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 956-964.

Maciag, S. S., Bellaver, F. V., Bombassaro, G., Haach, V., Morés, M. A. Z., Baron, L. F., ... & Bastos, A. P. (2022). On the influence of the source of porcine colostrum in the development of early immune ontogeny in piglets. *Scientific Reports*, 12(1), 15630.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). Brock Biología de los microorganismos 12 ed. Editorial Pearson Prentice Hall Iberia, Madrid. Pp, 1064.

Magnoli, A. P., Rodriguez, M. C., Gonzalez Pereyra, M. L., Poloni, V. L., Peralta, M. F., Nilson, A. J., ... & Cavaglieri, L. R. (2017). Use of yeast (*Pichia kudriavzevii*) as a novel feed additive to ameliorate the effects of aflatoxin B 1 on broiler chicken performance. *Mycotoxin Research*, 33, 273-283.

Manual Topigs Norsvin TN70: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://topigsnorsvin.mx/tn-content/uploads/2021/02/Manual-Piglets-ESP.pdf

Manual Topigs Norsvins. Manejo de Lechones: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://topigsnorsvin.com/tn-content/uploads/2020/02/Manual_TN70_ESP_v9_small.pdf

Markowiak, P. & Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients,* 9(9), 1021.

Markowska-Daniel, I. & Pomorska-Mol, M. (2010). Shifts in immunoglobulins levels in the porcine mammary secretions during whole lactation period. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy,* 54, 345-349.

Markowska-Daniel, I., Pomorska-Mól, M. & Pejsak, Z. (2010). Dynamic changes of immunoglobulin concentrations in pig colostrum and serum around parturition. *Polish Journal of Veterinary Sciences,* 13(1), 21.

Massuquetto, A., Panisson, J. C., Marx, F. O., Surek, D., Krabbe, E. L. & Maiorka, A. (2019). Effect of pelleting and different feeding programs on growth performance, carcass yield, and nutrient digestibility in broiler chickens. *Poultry Science*, 98(11), 5497–5503.

Massuquetto, A., Panisson, J. C., Schramm, V. G., Surek, D., Krabbe, E. L. & Maiorka, A. (2020). Effects of feed form and energy levels on growth performance, carcass yield and nutrient digestibility in broilers. *Animal,* 14(6), 1139–1146.

Mazzoli, R., Bosco, F., Mizrahi, I., Bayer, E. A. & Pessione, E. (2014). Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnology Advances*, 32(7), 1216-1236.

McFarland, L. V. (2015). From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60 (suppl_2), S85-S90.

Miles, A. A., Misra, S. S. & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection*, 38(6), 732-749.

Ministerio de Economía, Secretaría de Bioeconomía. SENASA. Recuperado de Página web Argentina.gob.ar. Aves. https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/cadenaanimal/aves

Moradi, R., Nosrati, R., Zare, H., Tahmasebi, T., Saderi, H. & Owlia, P. (2018). Screening and characterization of in-vitro probiotic criteria of *Saccharomyces* and *Kluyveromyces strains. Iranian Journal of Microbiology*, 10(2), 123.

Mouffok, C., Semara, L., Ghoualmi, N. & Belkasmi, F. (2019). Comparison of some non-linear functions for describing broiler growth curves of cobb500 strain. *Poultry Science,* 7, 51–61.

Murari, C. S., Machado, W. R. C., Schuina, G. L. & Del Bianchi, V. L. (2019). Optimization of Bioethanol Production from Cheese Whey Using *Kluyveromyces marxianus* URM 7404. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,* 20, 101182.

Nelson, J. & Grayson, D. (2017). World business council for sustainable development (WBCSD). In Corporate Responsibility Coalitions (pp. 300-317). Routledge.

Nempont, C., Cayet, D., Rumbo, M., Bompard, C., Villeret, V. & Sirard, J. C. (2008). Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *The Journal of Immunology*, 181(3), 2036-2043.

Nijkamp JF, van den Broek M, Datema E, de Kok S, Bosman L, Luttik MA, Daran-Lapujade P, Vongsangnak W, Nielsen J, Heijne WHM, Klaassen P, Paddon CJ, Platt D, Kötter P, van Ham RC, Reinders MJT, Pronk JT, de Ridder D & Daran JM (2012) De novo sequencing, assembly and analysis of the genome of the laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D, a model for modern industrial biotechnology. *Microbial Cell Factory,* 11 (1):36.

Ningtyas, D. W., Bhandari, B., Bansal, N. & 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.

Nurcholis M, Lertwattanasakul N, Rodrussamee N, Kosaka T, Murata M & Yamada M. (2020). Integration of comprehensive data and biotechnological tools for industrial applications of *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*,104(2):475-488

Nurcholis, M., Nitiyon, S., Suprayogi, Rodrussamee, N., Lertwattanasakul, N., Limtong, S., ... & Yamada, M. (2019). Functional analysis of Mig1 and Rag5 as expressional regulators in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 103, 395-410.

Obermeier, F., Kojouharoff, G., Hans, W., Schölmerich, J., Gross, V. & Falk, W. (1999). Interferon-gamma (IFN-γ)-and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clinical & Experimental Immunology,* 116(2), 238-245.

Oliver, A. E., Crowe, L. M. & Crowe, J. H. (1998). Methods for dehydration-tolerance: Depression of the phase transition temperature in dry membranes and carbohydrate vitrification. *Seed Science Research*, 8(2), 211–221.

Pais, P., Almeida, V., Yılmaz, M. & Teixeira, M. C. (2020). *Saccharomyces boulardii*: what makes it tick as successful probiotic? *Journal of Fungi*, 6(2), 78.

Palma, M. L., Zamith-Miranda, D., Martins, F. S., Bozza, F. A., Nimrichter, L., Montero-Lomeli, M., ... & Douradinha, B. (2015). Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement? *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*, 6563-6570.

Pang, Y., Zhang, H., Wen, H., Wan, H., Wu, H., Chen, Y., ... & Liu, X. (2022). Yeast probiotic and yeast products in enhancing livestock feeds utilization and performance: An overview. *Journal of Fungi*, 8(11), 1191.

Pendón, M. D., Madeira, J. V., Romanin, D. E., Rumbo, M., Gombert, A. K. & Garrote, G. L. (2021). A biorefinery concept for the production of fuel ethanol, probiotic yeast, and whey protein from a by-product of the cheese industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 3859-3871.

Peng, X., Yan, C., Hu, L., Huang, Y., Fang, Z., Lin, Y., ... & Che, L. (2020). Live yeast supplementation during late gestation and lactation affects reproductive performance, colostrum and milk composition, blood biochemical and immunological parameters of sows. *Animal Nutrition,* 6(3), 288-292.

Pennacchia, C., Blaiotta, G., Pepe, O. & Villani, F. (2008). Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), 1919-1928.

Perali, C., Magnoli, A. P., Aronovich, M., Rosa, C. A. D. R. & Cavaglieri, L. R. (2020). *Lithothamnium calcareum (Pallas) Areschoug* seaweed adsorbs aflatoxin B 1 in vitro and improves broiler chicken's performance. *Mycotoxin research*, 36, 371-379.

Pérez-Torrado, R., Gamero, E., Gómez-Pastor, R., Garre, E., Aranda, A. & Matallana, E. (2015). Yeast biomass, an optimised product with myriad applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology,* 46(2), 167-175.

Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition*, 10, S49-S66.

Potes, C. A. & Silva, R. A. (2022). El subsistema azucarero en Argentina. Apuntes Agroeconómicos, 16(23), 6

Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(4), 397-403.

Preciado-Saldaña, A. M., Ruiz-Canizales, J., Villegas-Ochoa, M. A., Domínguez-Avila, J. A. & González-Aguilar, G. A. (2022). Aprovechamiento de subproductos de la industria agroalimentaria. Un acercamiento a la economía circular. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha,* 23(2), 92-99.

Quek, S. Y., Chok, N. K. & Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(5), 386-392.

Querol, A. & Fleet, G. H. (2006). Yeasts in food and beverages. Part of the book series: The Yeast Handbook. Querol, A., & Fleet, G. H. (Eds.). ISSN 2626-885X. Springer Berlin, Heidelberg.

Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R. Q., Stojiljkovic, M., Foulquié-Moreno, M. R. & Thevelein, J. M. (2015). Looking beyond *Saccharomyces:* the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Research*, 15(6), fov053.

Raghavendran, V., Basso, T. P., Da Silva, J. B., Basso, L. C. & Gombert, A. K. (2017). A simple scaled down system to mimic the industrial production of first-generation fuel ethanol in Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110, 971-983.

Rai, A. K., Pandey, A. & Sahoo, D. (2019). Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 129-137.

Rajam, R. & Subramanian, P. (2022). Encapsulation of probiotics: past, present and future. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences ,* 11(1), 46.

Rao NS, Lundberg L, Palmkron S, Håkansson S, Bergenståhl B, Carlquist M. (2021) Flow cytometric analysis reveals culture condition dependent variations in phenotypic heterogeneity of *Limosilactobacillus reuteri*. *Scientific Reports*, 11(1):23567.

Reale, A., Di Renzo, T., Preziuso, M., Panfili, G., Cipriano, L., & Messia, M. C. (2019). Stabilization of sourdough starter by spray drying technique: New breadmaking perspective. *LWT, Food Science and Technology*, 99, 468-475.

Redondo, E. A., Redondo, L. M., Bruzzone, O. A., Diaz-Carrasco, J. M., Cabral, C., Garces, V., ... & Fernandez-Miyakawa, M. E. (2021). Tannins and gut health in broilers: Effects of a blend of chestnut and quebracho tannins on gut health and performance of broiler chickens. *bioRxiv*.

Redondo, L. M., Redondo, E. A., Delgado, F. O., La Sala, L. F. & Fernandez Miyakawa, M. E. (2016). An experimental reproduction of necrotic enteritis in broiler chickens. *Journal of Veterinary Science and Medicine,* 4, 1–5.

Ribert, P., Dupont, S., Roudaut, G. & Beney, L. (2021). Effect of devitrification on the survival and resistance of dried *Saccharomyces cerevisiae yeast*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 6409-6418.

Rivera, N. A., Lagunes, R. S. & Vázquez, T. D. J. D. (2019) Competitividad de biorrefinerías de sistemas agroindustriales. División de Ciencias Sociales y Humanidades, 57.

Rocha, S. N., Abrahão-Neto, J., Cerdán, M. E., Gombert, A. K. & González-Siso, M. I. (2011). Heterologous expression of a thermophilic esterase in *Kluyveromyces* yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 375-385.

Romanin, D. E., Llopis, S., Genovés, S., Martorell, P., Ramón, V. D., Garrote, G. L. & Rumbo, M. (2016). Probiotic yeast *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 shows anti-inflammatory and anti-oxidative stress properties in in vivo models. *Beneficial Microbes*, 7(1), 83-93.

Romanin, D., Serradell, M., Maciel, D. G., Lausada, N., Garrote, G. L. & Rumbo, M. (2010). Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 102-108.

Rumbo, M., Sierro, F., Debard, N., Kraehenbuhl, J. P. & Finke, D. (2004). Lymphotoxin β receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium. *Gastroenterology*, 127(1), 213-223.

Saber, A., Alipour, B., Faghfoori, Z. & Khosroushahi, A. Y. (2017). Secretion metabolites of dairy *Kluyveromyces marxianus* AS41 isolated as probiotic, induces apoptosis in different human cancer cell lines and exhibit anti-pathogenic effects. *Journal of Functional Foods*, 34, 408-421.

Sampath, V., Shalakhti, O., Veidis, E., Efobi, J. A. I., Shamji, M. H., Agache, I., ... & Nadeau, K. C. (2023). Acute and chronic impacts of heat stress on planetary health. *Allergy,* 78(8), 2109-2120.

Sanders, M.E.; Gibson, G.; Harsharnjit, S.G.& Guarner, F. (2007). Probiotics: Their Potential to Impact Human Health, CAST Issue Paper, 36, 1–20.

Saratale, G.D., Saratale, R.G., Ghodake, G.S., Jiang, Y.Y., Chang, J.-S., Shin, H.-S. & Kumar, G. (2017). Solid state fermentative lignocellulolytic enzymes production, characterization and its application in the

saccharification of rice waste biomass for ethanol production: An integrated biotechnological approach. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers,* 76, 51–58.

Satessa, G. D., Kjeldsen, N. J., Mansouryar, M., Hansen, H. H., Bache, J. K. & Nielsen, M. O. (2020). Effects of alternative feed additives to medicinal zinc oxide on productivity, diarrhea incidence and gut development in weaned piglets. *Animal*, 14(8), 1638-1646.

Schutyser, M. A., Perdana, J. & Boom, R. M. (2012). Single droplet drying for optimal spray drying of enzymes and probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 27(2), 73-82.

Sen, S. & Mansell, T. J. (2020). Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. *Fungal Genetics and Biology*, 137, 103333.

Sharma, D., Manzoor, M., Yadav, P., Sohal, J. S., Aseri, G. K. & Khare, N. (2018). Bio-valorization of dairy whey for bioethanol by stress-tolerant yeast. *Fungi and their role in sustainable development: Current perspectives,* 349-366.

Siesto, G., Pietrafesa, R., Infantino, V., Thanh, C., Pappalardo, I., Romano, P. & Capece, A. (2022). In vitro study of probiotic, antioxidant and anti-inflammatory activities among indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Foods*, 11(9), 1342.

Signori L., Passolunghi S., Ruohonen L., Porro D. & Branduardi P. (2014.) Effect of oxygenation and temperature on glucose-xylose fermentation in *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain. *Microbial Cell Factory,* 13:1–13.

Silva, J., Freixo, R., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2011). Spray-drying for the production of dried cultures. *International Journal of Dairy Technology*, 64(3), 321-335.

Silveira W.B., Passos F.J.V., Mantovani H.C. & Passos F.M.L. (2005). Ethanol production from cheese whey permeate by Kluyveromyces marxianus UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. *Enzyme and Microbial Technology,* 36:930–936.

Singh, R. P., Shadan, A. & Ma, Y. (2022). Biotechnological applications of probiotics: a multifarious weapon to disease and metabolic abnormality. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(6), 1184-1210.

Smith I.M., Baker A., Arneborg N.& Jespersen L. (2015). Non-*Saccharomyces* yeasts protect against epithelial cell barrier disruption induced by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology,* 61:491–497.

Soraci, A. L., Decundo, J. M., Dieguez, S. N., Martínez, G., Gaudio, D. S. P. & Amanto, F. A. (2023). Citrullinemia is a suitable biomarker for post weaning performance in piglets under intensive farming. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 261(6), 858-864.

Southgate, D. A. 1976 Determination of food carbohydrates, pp. 99–144. Barking, Essex: UK Applied Science Publishers

Sribounoy, U., Pirarat, N., Solval, K. M., Sathivel, S. & Chotiko, A. (2021). Development of pelleted feed containing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Jerusalem artichoke* for Nile Tilapia and its biocompatibility studies. *3 Biotech*, 11(6).

Stambury P.F., Whitaker A. & Hall S.J. (1995). Principles of fermentation technology. Elsevier/Pergamon publications. BPC Wheatons Ltd, Exeter, p. 357.

Sun, H. Y. & Kim, I. H. (2019). Dietary supplementation of mixed yeast culture derived from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces maxianus*: effects on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, blood parameters, and gut health in broilers. *The Journal of Poultry Science*, 56(2), 140-147.

Talamoni S., Castells M.L., Gonzalez M. & Karlen J. (2023). Análisis INTI – Industria para el Desarrollo.https://www.inti.gob.ar/assets/uploads/files/economia-industrial/02-2023/lactosuero_argentina_final.pdf

Tasteyre, A., Barc, M.C., Karjalainen, T., Bourlioux, P. & Collignon, A. (2002). Inhibition of in vitro cell adherence of *Clostridium difficile* by *Saccharomyces boulardii. Microbial Pathogenesis,* 32, 219–225.

Teijeiro, M., Pérez, P. F., De Antoni, G. L. & Golowczyc, M. A. (2018). Suitability of kefir powder production using spray drying. *Food Research International*, 112, 169-174.

Teyssier, J.-R., Brugaletta, G., Sirri, F., Dridi, S. & Rochell, S. J. (2022). A review of heat stress in chickens. Part II: Insights into protein and energy utilization and feeding. *Frontiers in Physiology*, 13, 943612.

Thompson NT, Kitzenberg DA & Kao DJ. (2023). Persister-mediated emergence of antimicrobial resistance in agriculture due to antibiotic growth promoters. *AIMS Microbiology*, 9(4):738-756.

Tiago, F. D. C. P., Martins, F. D. S., Souza, E. L. S., Pimenta, P. F. P., Araújo, H. R. C., Castro, I. D. & Nicoli, J. R. (2012). Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. *Journal of Medical Microbiology*, 61(9), 1194-1207.

Tomičić, R., Tomičić, Z. & Raspor, P. (2022). Influence of culture conditions on co-aggregation of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* with *Candida* spp. and their auto-aggregation. *Folia Microbiologica*, 67(3), 507-515.

Toothaker R.D. & Elmer G.W. (1984). Prevention of clindamycin-induced mortality in hamsters by *Saccharomyces boulardii. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26(4):552-6.

Touhami, A., Hoffmann, B., Vasella, A., Denis, F. A. & Dufreˆne, Y. F. (2003). Aggregation of yeast cells: direct measurement of discrete lectin–carbohydrate interactions. *Microbiology,* 149(10), 2873-2878.

Trigo, E., Regúnaga, M., Costa, R. & Coremberg, A. (2015). Bioeconomía en Argentina: alcances, situación actual y oportunidades para el desarrollo sustentable. La bioeconomía. Nuevo marco para el crecimiento sostenible en América Latina, 25.

Van Mulders, S. E., Ghequire, M., Daenen, L., Verbelen, P. J., Verstrepen, K. J. & Delvaux, F. R. (2010). Flocculation gene variability in industrial brewer's yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 88, 1321-1331.

Vandenberghe, L. P. S., Valladares-Diestra, K. K., Bittencourt, G. A., Torres, L. Z., Vieira, S., Karp, S. G., ... & Soccol, C. R. (2022). Beyond sugar and ethanol: The future of sugarcane biorefineries in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 167, 112721.

Vermandere K., Bostick R.M., Tran H.Q., Gewirtz A.T., Barry E.L., Rutherford R.E., Seabrook M.E. & Fedirko V. (2021). Effects of Supplemental Calcium and Vitamin D on Circulating Biomarkers of Gut Barrier Function in Patients with Colon Adenoma: A Randomized Clinical Trial. *Cancer Prevention Research (Phila)*, 14(3):393-402.

Viggo, D. (2001). Avance en nutrición y alimentación animal. Recuperado de http://www. etsca. upm. es/fedna/capitulos/98capXII. pdf.

Vorländer, K., Pramann, P., Kwade, A., Finke, J. H. & Kampen, I. (2023). Process and formulation parameters influencing the survival of *Saccharomyces cerevisiae* during spray drying and tableting. *International Journal of Pharmaceutics*, 123100.

Wagner, J. M. & Alper, H. S. (2016). Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: current tools and future advances. *Fungal Genetics and Biology*, 89, 126-136.

Wang A. & Zhong Q. (2024). Drying of probiotics to enhance the viability during preparation, storage, food application, and digestion: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(1): e13287.

Wang, J., Liu, S., Ma, J., Dong, X., Long, S. & Piao, X. (2023). Growth performance, serum parameters, inflammatory responses, intestinal morphology and microbiota of weaned piglets fed 18% crude protein diets with different ratios of standardized ileal digestible isoleucine to lysine. *Animal Nutrition,* 4 (16): 313-325.

Wang, Y. & Gu, Q. (2010). Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers. *Research in Veterinary Science*, 89(2), 163-167.

Wickramasuriya, S. S., Park, I., Lee, K., Lee, Y., Kim, W. H., Nam, H. & Lillehoj, H. S. (2022). Role of Physiology, Immunity, Microbiota, and Infectious Diseases in the Gut Health of Poultry. *Vaccines*, 10(2):172.

Xie, Y., Zhang, H., Liu, H., Xiong, L., Gao, X., Jia, H., ... & Han, T. (2015). Hypocholesterolemic effects of *Kluyveromyces marxianus* M3 isolated from Tibetan mushrooms on diet-induced hypercholesterolemia in rat. *Brazilian Journal of Microbiology,* 46, 389-395.

Xing, T., Pan, X., Zhang, L. & Gao, F. (2021). Hepatic oxidative stress, apoptosis, and inflammation in broiler chickens with wooden breast myopathy. *Frontiers in Physiology*, 12, 659777.

Xu, H., Jeong, H. S., Lee, H. Y. & Ahn, J. (2009). Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in Applied Microbiology*, 49(4), 434-442.

Yadav JS, Yan S, Pilli S, Kumar L, Tyagi RD & Surampalli RY. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33(6 Pt 1):756-74.

Yerpes, M., Llonch, P. & Manteca, X. (2020). Factors associated with cumulative first-week mortality in broiler chicks. *Animals*, 10(2), 310.

Zanello, G., Meurens, F., Serreau, D., Chevaleyre, C., Melo, S., Berri, M., ... & Salmon, H. (2013). Effects of dietary yeast strains on immunoglobulin in colostrum and milk of sows. *Veterinary Immunology and Immunopathology,* 152(1-2), 20-27.

Zavala, L., Golowczyc, M. A., Van Hoorde, K., Medrano, M., Huys, G., Vandamme, P. & Abraham, A. G. (2016). Selected *Lactobacillus* strains isolated from sugary and milk kefir reduce *Salmonella* infection of epithelial cells in vitro. *Beneficial Microbes*, 7(4), 585-595.

Zayed, G. & Roos, Y. H. (2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry*, 39(9), 1081-1086.

Zhang, C., Cheng, H., Han, Y., Wa, Y., Chen, D., Guan, C., ... & Gu, R. (2022). Transcriptome-phenotype matching analysis of how nitrogen sources influence *Lacticaseibacillus rhamnosus* tolerance to heat stress and oxidative stress. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 257. (b)

Zhang, C., Han, Y., Gui, Y., Wa, Y., Chen, D., Huang, Y., ... & Gu, R. (2022). Influence of nitrogen sources on the tolerance of *Lacticaseibacillus rhamnosus* to heat stress and oxidative stress. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 49(5), kuac020. (a)

Zhang, Q., Li, J., Cao, M., Li, Y., Zhuo, Y., Fang, Z., ... & Wu, D. (2020). Dietary supplementation of *Bacillus subtilis* PB6 improves sow reproductive performance and reduces piglet birth intervals. *Animal Nutrition,* 6(3), 278-287.

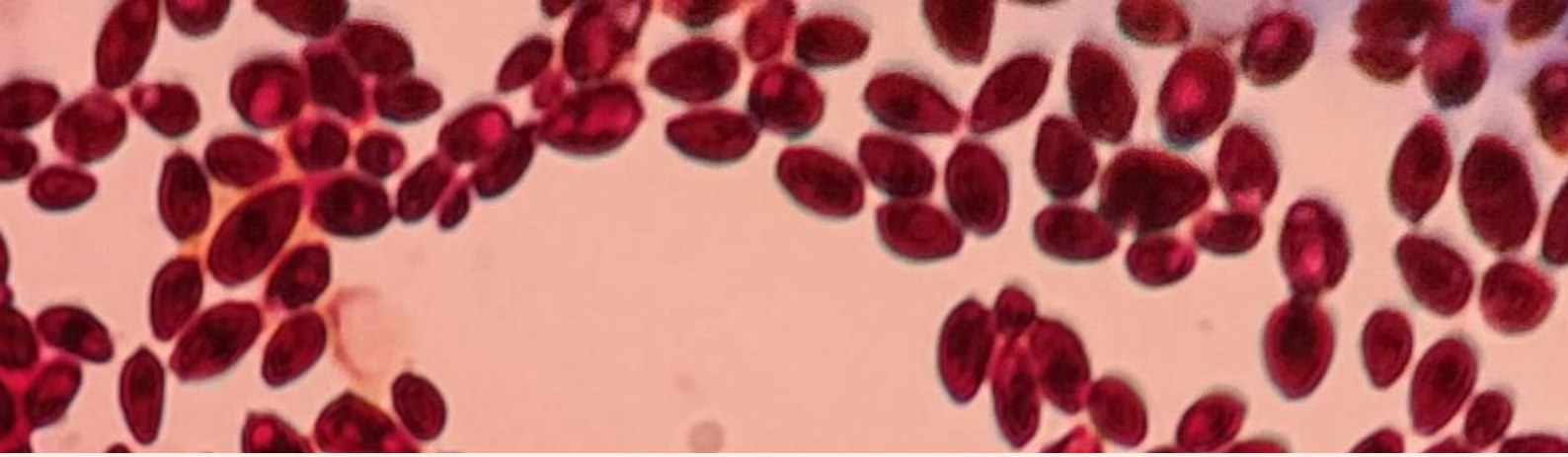
Zhao, G. & Zhang, G. (2005). Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology,* 99(2), 333-338.

Zhao, W., Yuan, M., Li, P., Yan, H., Zhang, H. & Liu, J. (2019). Short-chain fructo-oligosaccharides enhances intestinal barrier function by attenuating mucosa inflammation and altering colonic microbiota composition of weaning piglets. *Italian Journal of Animal Science*, 18(1), 976-986.

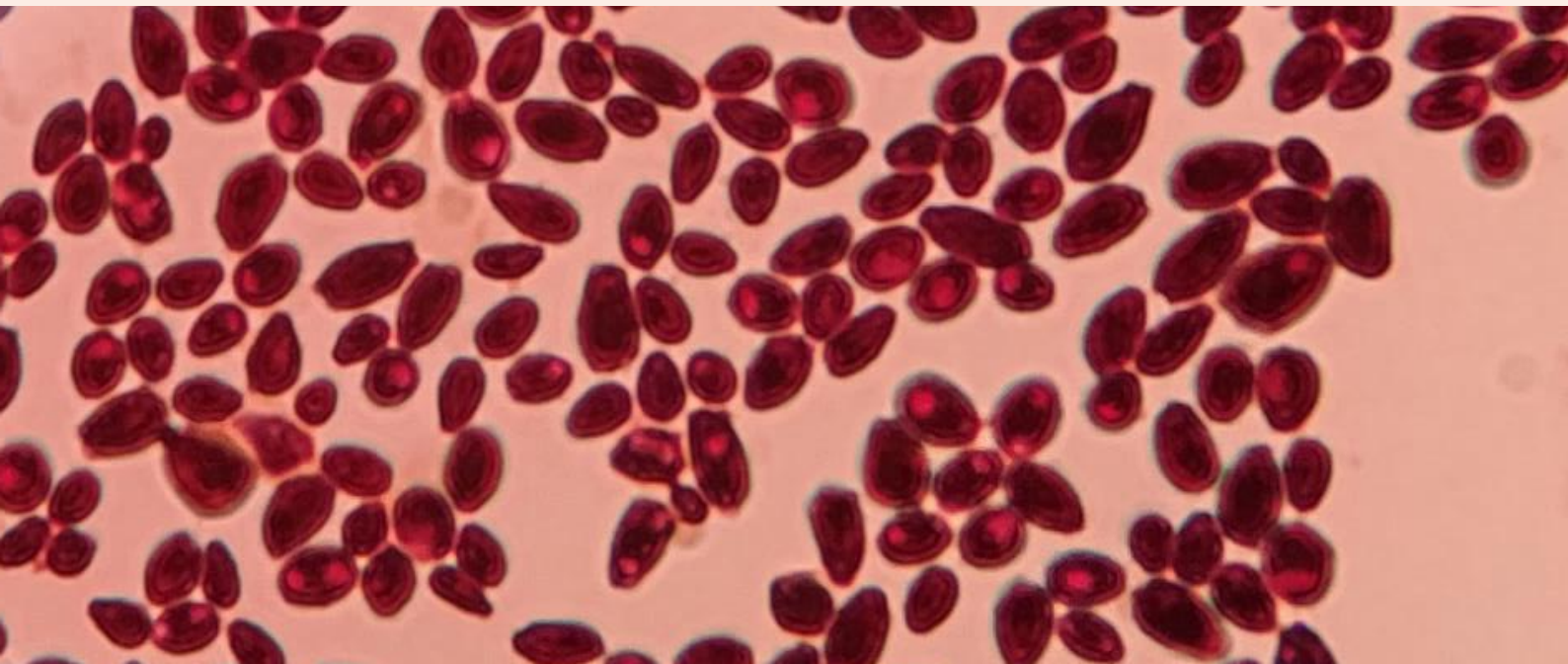
Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, W. O'Toole, Pot B., Vandamme P., Walter J.,9,10, Watanabe K., Wuyt S., Felis G., Gänzle M.,& Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 70(4), 2782-2858.

Zhu Q, Sun P, Zhang B, Kong L, Xiao C & Song Z. (2021) Progress on Gut Health Maintenance and Antibiotic Alternatives in Broiler Chicken Production. *Frontiers in Nutrition,* 8:692839.

Ziegler T.R., Luo M., Estívariz C.F., Moore D.A. 3rd, Sitaraman S.V., Hao L., Bazargan N., Klapproth J.M., Tian J., Galloway J.R., Leader L.M., Jones D.P. & Gewirtz A.T. (2008). Detectable serum flagellin and lipopolysaccharide and upregulated anti-flagellin and lipopolysaccharide immunoglobulins in human short bowel syndrome. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(2): R402-10.



Considerando el interés mundial y en particular en nuestra región por el desarrollo de fuentes de energía renovables para incrementar el parque energético, la búsqueda de alternativas que permitan incrementar el rendimiento económico del proceso de producción de bioetanol junto a la generación de biomasa con potencial uso como probiótico para mejorar la salud humana y/o veterinaria es sin duda de gran impacto.

La melaza de caña de azúcar proveniente de los ingenios, así como el suero de quesería proveniente de la industria láctea constituyen dos subproductos alimentarios altamente contaminantes debido principalmente a su composición química y los grandes volúmenes que se generan a diario. Atendiendo esta demanda de búsqueda de alternativas de valorización y también la reducción del uso de combustibles fósiles, en el presente trabajo de tesis se diseñó un proceso de biorrefinería que consistió en el empleo de levaduras *Kluyveromyces marxianus* para la obtención de etanol combustible y biomasa probiótica a partir de melaza o lactosuero. Para ello, se propusieron como objetivos específicos: evaluar la capacidad de levaduras del género *Kluyveromyces* de desarrollar y producir etanol en lactosuero y melaza de caña, estudiar las características probióticas de las levaduras crecidas en los distintos sustratos focalizando en la actividad antiinflamatoria del tracto gastrointestinal y antagonismo contra patógenos, optimizar y escalar la producción de biomasa de la/las cepas seleccionadas, estudiar diferentes métodos de conservación de la biomasa de levadura con capacidad probiótica y evaluar los beneficios sobre la salud y parámetros productivos al administrar la levadura obtenida a animales de producción.

La levadura *K. marxianus* CIDCA 9121 demostró poseer propiedades tecnológicas y funcionalidad biológica adecuadas para ser implementada en una biorrefinería a base de suero de quesería para la obtención de etanol combustible y biomasa probiótica.