

**FRUCTO-OLIGOSACÁRIDOS DE  
CADENA CORTA COMO  
PROTECTORES DE BACTERIAS  
LÁCTICAS DESHIDRATADAS.  
SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y  
APLICACIÓN**

**LIC. N. ROMANO**



**UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

**TESIS DOCTORAL**

**FRUCTO-OLIGOSACÁRIDOS DE CADENA CORTA COMO  
PROTECTORES DE BACTERIAS LÁCTICAS  
DESHIDRATADAS. SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y  
APLICACIÓN**

**Lic. en Biotecnología Nelson Gastón Romano**

Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas

La Plata, Argentina

2016

**TESIS DOCTORAL**

**FRUCTO-OLIGOSACÁRIDOS DE CADENA CORTA COMO  
PROTECTORES DE BACTERIAS LÁCTICAS DESHIDRATADAS.  
SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN**

**Lic. en Biotecnología Nelson Gastón Romano**

Presentada en la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La  
Plata para la obtención del grado académico de

**Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas**

Directora:

**Dra. Andrea Gómez-Zavaglia**

Co-Director:

**Dr. Pablo Mobili**

Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas  
La Plata, Argentina

2016



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Univeridad Nacional de La Plata, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), UNLP-CONICET-CIC



**CIDCA**



# PREFACIO

La nutrición moderna busca el equilibrio entre la calidad de los alimentos y la promoción de la salud. Este nuevo paradigma ha llevado a una creciente demanda de alimentos bioactivos, que aporten beneficios sobre la salud humana y animal más allá de la nutrición básica. En este contexto se desarrolló el presente trabajo de tesis, donde se aborda el estudio de los fructo-oligosacáridos (FOS), es decir, azúcares cuya capacidad de estimulación selectiva de la microbiota intestinal (efecto prebiótico) ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, su capacidad protectora durante procesos de deshidratación de bacterias ácido lácticas ha sido escasamente explorada. En su conjunto los resultados obtenidos en este trabajo buscan expandir el uso de los FOS en alimentos deshidratados como aporte de fibra prebiótica y como protectores de bacterias ácido lácticas en dichas matrices, propiciando así el desarrollo de nuevos alimentos funcionales que incorporen prebióticos y probióticos.

El trabajo se compone de una introducción general, que contiene las definiciones básicas de los conceptos de bacterias lácticas, probióticos, prebióticos, y la importancia de éstos a nivel tecnológico y de la salud. También se describen aspectos relacionados con la incorporación de probióticos y prebióticos en matrices alimenticias, haciendo foco en la preservación de bacterias lácticas en alimentos deshidratados. Además se abordan los mecanismos involucrados en la preservación de microorganismos mediada por azúcares, destacando el empleo de azúcares prebióticos.

En el capítulo 1 se presenta el estudio de la síntesis enzimática de FOS a partir de sacarosa, analizando el efecto del sustrato sobre la composición de los oligosacáridos obtenidos. Adicionalmente, se muestra la puesta a punto del monitoreo de la síntesis mediante espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR) como alternativa al monitoreo clásico por cromatografía líquida de alta *performance* (HPLC).

En el capítulo 2 se estudia la capacidad protectora de mezclas de FOS de diferente composición con el objetivo de comprender los mecanismos de protección de estos azúcares durante la liofilización de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA333, una cepa especialmente sensible a todo tipo de estrés.

En el capítulo 3 se describen los resultados del empleo de FOS durante la deshidratación de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA333 mediante vacío asistido por microondas a escala piloto.

En la primera parte del capítulo 4 se presenta el desarrollo de películas comestibles de metilcelulosa como vehículo para la incorporación FOS y la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114 (cepa elegida por sus características tecnológicas y potencial probiótico) en alimentos deshidratados. El abordaje incluye el análisis del efecto de la incorporación de FOS y microorganismos en las películas, así como la estabilidad del sistema tanto desde el punto de vista fisicoquímico como microbiológico. En la segunda parte, se aplican los conocimientos desarrollados en la tesis para la funcionalización de un *snack* deshidratado de manzana con FOS y *L. plantarum* CIDCA 83114 inmovilizado en las películas de metilcelulosa previamente desarrolladas. Se estudian los *snacks* desde el punto de vista tecnológico (propiedades físicas, características sensoriales, etc.) y microbiológico (viabilidad bacteriana durante el almacenamiento y la digestión gástrica simulada).

Finalmente se realiza una Discusión General acerca de las evidencias científicas aportadas en este trabajo de tesis y las inquietudes para futuras investigaciones en el campo de los prebióticos y su aplicación en alimentos funcionales.

## Los resultados del presente trabajo han sido parcialmente publicados en:

### Artículos.

1. "Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*." Food Research International. 2016. 90: 251-258. Autores: **Nelson Romano**, Carolina Schebor, Pablo Mobili, Andrea Gomez-Zavaglia."
2. "Effect of sucrose concentration on the composition of enzymatically synthesized short-chain fructo-oligosaccharides as determined by FTIR". Food Chem. 2016. 202: 467–475. Autores: **Nelson Romano**, Mauricio Santos, Pablo Mobili, Roberto Vega-Paulino, Andrea Gomez-Zavaglia.
3. "Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of methylcellulose containing *Lactobacillus plantarum*". Journal of Functional Foods. 2015. 16: 164–173. Autores: María José Tavera, **Nelson Romano**, Pablo Mobili, Nora Bértola, Andrea Gómez-Zavaglia, Adriana Pinotti, Nora Bertola.
4. "Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria" Food Research International. 2014. 64: 560–566. Autores: **Nelson Romano**, María José Tavera, Pablo Mobili, Adriana Pinotti, Nora Bértola, Andrea Gomez-Zavaglia.
5. "Prebiotics as protectants of lactic acid bacteria". Capítulo 10, páginas 155-164. En: Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics (Elsevier). 2015. 2da Edición. Parte 1: Prebiotics in health promotion. Editores: R.R. Watson & V.R. Preedy. ISBN: 978-0-12-802189-7. Autores: **Nelson Romano**, Elizabeth Tymczynsyn, Pablo Mobili, Andrea Gomez-Zavaglia.

### Patentes

6. "**Producto alimenticio funcionalizado con probióticos y prebióticos y método para su preparación**" (en trámite) Instituto Nacional de la Propiedad Intelectual (INPI). Inventores: M.J. Tavera-Quiroz, **N. Romano**, P. Mobili, A. Pinotti, A. Gómez-Zavaglia, N. Bertola. Fecha de presentación 05/08/2015. Titular: CONICET/UNLP. Acta: P20150102508.

### Trabajos completos publicados en actas de congresos:

7. Preservación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. plantarum* en películas biodegradables de metilcelulosa. Libro de resúmenes del *International Conference on Food Innovation (Food Innova)*. ISBN: 978-950-698-340-6. (2014). Autores: **Nelson Romano**; M J. Tavera Quiroz; N. Bertola; P. Mobili; A. Pinotti; A. Gómez-Zavaglia.

#### **Presentaciones a congresos:**

1. "Monitoring the composition of short chain fructo-oligosaccharides produced during transfructosylation reactions by means of infrared spectroscopy". (Poster). *16th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules - ECSBM 2015*. 6-10/09/2015. Bochum (Germany). Autores: **N. Romano**, M. Santos, P. Mobili, ME. Zuñiga-Hansen, A. Gomez-Zavaglia.
2. "Methylcellulose-based films containing FOS and lactic acid bacteria for the formulation of a functional food". (Poster). *6th International Conference on Science and Technology of Composite Materials (COMAT)*. 7-8/5/2015. Buenos Aires, Argentina. Autores: **N. Romano**, MJ.Tavera Quiroz, P. Mobili, N. Bertola, A. Gómez-Zavaglia, A. Pinotti.
3. "Preservación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. plantarum* en películas biodegradables de metilcelulosa". (Poster). *International Conference on Food Innovation (Food Innova)*. 20-23/10/2014. Concordia, Entre Ríos (Argentina). Autores: **N. Romano**; M J. Tavera Quiroz; N. Bertola; P. Mobili; A. Pinotti; A. Gómez-Zavaglia.
4. "Effect of ethanol pretreatment and fructo-oligosaccharides on the growth of bacterial strains isolated from agave must in a synthetic mezcal medium". (Poster). *IV Simposio Internacional de Bacterias Lácticas (SIBAL)*. Alimentos, Salud y Aplicaciones. 16-18/10/2013. Tucumán (Argentina). Autores: **N. Romano**, L. Pedroni, E. Gerbino, P. Mobili, A. Gómez-Zavaglia.

## **Agradecimientos**

La realización de esta tesis de doctorado, implicó muchas horas de esfuerzo y dedicación y no hubiese sido posible sin la invaluable colaboración de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a su fin. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, por haberme permitido realizar mis estudios de postgrado y al Centro de investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos por haberme brindado el espacio físico para la realización de este trabajo.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (AGENCIA) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme las becas que me permitieron llevar a cabo este trabajo.

Al CONICET, al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCYT) por aportar los medios económicos que permitieron realizar mis estadías en el exterior.

A la Dra. Andrea Gómez-Zavaglia por aceptarme para realizar este trabajo bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas han sido un aporte invaluable. Muchas gracias Andre!

Quiero dar también las gracias al Dr. Pablo Mobili por su importante aporte en la co-dirección de esta tesis, su participación activa indudablemente ha enriquecido el trabajo realizado. Muchas gracias Pablo!

Agradezco de manera especial a mis compañeros del grupo de Microbiología del CIDCA, por su amabilidad y buena disposición en todo momento. Su cooperación ha sido determinante para cumplir los objetivos de este trabajo. De igual manera agradezco a mis compañeros de box Ayelén, Sergio y Noelia y mi ex-compañera, ahora amiga, Naty Q.

A los compañeros del CIDCA, por su amabilidad y buena disposición, que han hecho amenos estos años de trabajo.

Agradezco a María José Tavera-Quiroz (Majito) y al grupo de películas del CIDCA, por la estrecha colaboración en este trabajo que nos apasiona, y por entender que cuando los conocimientos se complementan se aprende más.

Gracias al personal técnico del instituto, Javier, Daniel, Claudio, su buena disposición y capacidad de trabajo han hecho posible la realización de esta tesis.

Gracias a los amigos que han compartido estos años conmigo, Rodrigo, Jota, Renzo, Majo, Naty, Alejo, John, Leo, muchas gracias por bancarme!

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia, el motor de mi vida. Sin su apoyo, colaboración, consejos y afecto habría sido imposible llegar a este día. A mis padres, Marta y Germán, por su ejemplo de lucha, humildad y honestidad; gracias viejitos por mi vida toda! A mis hermanos Alejandro, Gustavo y Javier por su amistad, comprensión y generosidad; a mis tías Inés, Nena y especialmente a mi tía Berta que la quiero con todo mi corazón y a mis primos Manuel y Silvia, mis sobrinos, Romy, Santy, Francisco. Muchas Gracias!

A La memoria de mi tío Chilo, por su ejemplo de trabajo, que me alentó a seguir el doctorado. *Como se te extraña tío querido!*

Finalmente, debo agradecer a la educación pública y gratuita, por brindarme a mí y a tantos otros como yo la oportunidad de progresar. Gracias a la Esc. María Magdalena Goyechea de Güemes, a la Esc. Nacional de Educación Técnica N° 5.138 - Alberto Einstein, a la Universidad Nacional de San Martín, a la Universidad Nacional de La Plata y especialmente Al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA).

*A mis viejos.*



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
<i>Las bacterias ácido lácticas</i> .....	1
<i>Probióticos</i> .....	2
<i>Beneficios atribuidos al consumo de probióticos</i> .....	4
<i>El microbioma intestinal</i> .....	4
<i>Prebióticos</i> .....	5
<i>Fructanos como prebióticos</i> .....	7
<i>Preservación de bacterias lácticas y probióticos</i> .....	9
<i>Hipótesis de remplazo de moléculas de agua</i> .....	10
<i>Hipótesis de vitrificación</i> .....	12
<i>Métodos de preservación</i> .....	14
<i>Uso de prebióticos como protectores de probióticos y bacterias ácido lácticas starters</i> .....	16
<i>Simbióticos</i> .....	17
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	19
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	19
<b>CAPÍTULO I. Síntesis enzimática de Fructo-oligosacáridos monitoreada mediante espectroscopía FTIR y análisis multivariante. Efecto de la concentración de sustrato</b>	
<b>1.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	23
1.1.1 <i>Síntesis de FOS</i> .....	24
1.1.2 <i>Fructosiltransferasas</i> .....	26
1.1.3 <i>Espectroscopía de Infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR)</i> .....	28
1.1.3.1 <i>Absorción en el Infrarrojo</i> .....	28
1.1.3.2 <i>Modos Vibracionales</i> .....	29

1.1.3.3 Aspecto de las Bandas .....	31
1.1.3.4 Estudio de carbohidratos mediante FTIR .....	32
1.1.4 Métodos de análisis multivariante.....	33
1.1.4.1 Información Cualitativa.....	34
1.1.4.2 Información Cuantitativa.....	37
1.1.4.3 Monitoreo de la síntesis de FOS mediante Espectroscopia de Infrarrojo por Transformadas de Fourier (FTIR).....	38
<b>1.2 OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
<b>1.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
1.3.1 Síntesis de FOS.....	43
1.3.2 Análisis de la composición de los productos de síntesis mediante HPLC.....	44
1.3.3 Análisis de la composición de los productos de síntesis mediante FTIR.....	44
1.3.4 Análisis multivariante.....	46
1.3.5 Análisis estadístico.....	46
<b>1.4 RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
1.4.1 Análisis de la síntesis de FOS mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC).....	47
1.4.2 Efecto de la concentración de sacarosa inicial.....	47
1.4.3 Rendimientos de las síntesis de FOS.....	50
1.4.3.1 FOS totales.....	50
1.4.3.2 DP3, DP4 y DP5.....	50
1.4.4 Rendimiento de productos secundarios de reacción (Glucosa y Fructosa).....	53
1.4.5 Análisis de la síntesis de FOS mediante Espectroscopia de Infrarrojo por Transformadas de Fourier (FTIR).....	53
1.4.5.1 Espectros FTIR de los azúcares puros.....	53
1.4.5.2 Variación de los espectros durante la síntesis.....	54
1.4.5.3 Obtención de modelos PLS a partir de los espectros FTIR.....	56
<b>1.5 DISCUSIÓN.....</b>	<b>59</b>
<b>1.6 CONCLUSIONES.....</b>	<b>65</b>

**CAPÍTULO II. Fructo-oligosacáridos como protectores frente a la deshidratación de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus***

<b>2.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	69
2.1.2 <i>Transición vítrea</i> .....	70
2.1.3 <i>Preservación de microorganismos en estado vítreo</i> .....	70
2.1.4 <i>Fructo-oligosacáridos como protectores</i> .....	71
<b>2.2 OBJETIVOS</b> .....	73
<b>2.3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	75
2.3.1 <i>Síntesis de FOS</i> .....	75
2.3.2 <i>Purificación de los FOS obtenidos mediante síntesis enzimática</i> .....	75
2.3.2.1 <i>Preparación de la columna</i> .....	75
2.3.2.2 <i>Purificación de los FOS</i> .....	76
2.3.3 <i>Determinación de las temperaturas de transición vítrea (<math>T_g</math>)</i> .....	77
2.3.4 <i>Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento</i> .....	78
2.3.5 <i>Liofilización</i> .....	78
2.3.5.1 <i>Preparación de las muestras</i> .....	78
2.3.5.2 <i>Procedimiento de liofilización</i> .....	78
2.3.6 <i>Determinación del tiempo de latencia</i> .....	78
2.3.7 <i>Determinación del daño de la membrana</i> .....	79
2.3.8 <i>Almacenamiento</i> .....	79
2.3.9 <i>Análisis estadístico</i> .....	80
<b>2.4 RESULTADOS</b> .....	80
2.4.1 <i>Síntesis enzimática, purificación y selección de los FOS para preservación</i> .....	82
2.4.2 <i>Determinación de las temperaturas de transición vítrea</i> .....	84
2.4.3 <i>Efecto protector de las mezclas de FOS durante la liofilización de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CIDCA 333</i> .....	84
2.4.4 <i>Estimación del daño global luego de la liofilización</i> .....	87
2.4.5 <i>Almacenamiento de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CIDCA 333 liofilizado en presencia de FOS</i> .....	90
<b>2.5 DISCUSIÓN</b> .....	93
<b>2.6 CONCLUSIONES</b> .....	101

**CAPÍTULO III. Secado de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 en microondas y vacío a escala piloto. Efecto de FOS como protectores**

<b>3.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	105
3.1.1 <i>El secado por microondas y vacío</i> .....	106
<b>3.2 OBJETIVOS</b> .....	109
<b>3.3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	111
3.3.1 <i>Microorganismo</i> .....	111
3.3.2 <i>Optimización de las condiciones de crecimiento y el medio de cultivo</i> .....	111
3.3.3 <i>Obtención de la suspensión de microorganismos</i> .....	112
3.3.4 <i>Efecto de la concentración de FOS</i> .....	112
3.3.5 <i>Condiciones de secado</i> .....	112
3.3.6 <i>Actividad de agua (<math>a_w</math>; water activity)</i> .....	113
3.3.7 <i>Determinación del contenido de agua – Titulación de Karl Fischer</i> .....	113
3.3.8 <i>Viabilidad y daño de membrana</i> .....	113
<b>3.4 RESULTADOS</b> .....	115
3.4.1 <i>Optimización de la fermentación a escala piloto</i> .....	115
3.4.2 <i>Secado de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CIDCA 333 en vacío asistido por microondas</i> .....	121
3.4.2.1 <i>Equipo y condiciones de secado</i> .....	121
3.4.2.2 <i>Efecto de la concentración de FOS durante el secado</i> .....	123
<b>3.5 DISCUSIÓN</b> .....	127
<b>3.6 CONCLUSIONES</b> .....	129

**CAPÍTULO IV. Prebióticos como protectores de bacterias lácticas inmovilizadas en matrices alimenticias no lácteas**

<b>4.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	133
4.1.1 <i>Matrices alimenticias no lácteas como soporte para probióticos</i> .....	134
4.1.2 <i>Prebióticos como protectores de bacterias lácticas en matrices alimentarias</i> .....	135

**CAPÍTULO IV PARTE I. Bacterias lácticas inmovilizadas en películas de metilcelulosa y FOS**

4.1.1 INTRODUCCIÓN.....	139
4.1.1.1 Metilcelulosa como agente gelificante.....	140
4.1.1.2 Películas comestibles de metilcelulosa como recubrimientos de alimentos.....	141
4.1.1.3 Uso de sustancias protectoras en películas cargadas con probióticos.....	142
4.1.2 OBJETIVOS.....	143
4.1.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	145
4.1.3.1 Preparación de las soluciones formadoras de películas.....	145
4.1.3.2 Cepas y condiciones de crecimiento bacteriano.....	145
4.1.3.3 Preparación de las películas cargadas con bacterias.....	146
4.1.3.4 Recuento bacteriano en medio sólido.....	146
4.1.3.5 Microscopía electrónica de barrido.....	146
4.1.3.6 Espectros de FTIR de las películas cargadas con bacterias.....	147
4.1.3.7 Isotermas de adsorción de agua.....	147
4.1.3.8 Propiedades de barrera al vapor de agua.....	148
4.1.3.9 Análisis mecánico dinámico (DMA).....	148
4.1.3.10 Almacenamiento.....	149
4.1.3.11 Análisis estadístico.....	149
4.1.4 RESULTADOS.....	151
4.1.4.1 Obtención de películas de metilcelulosa cargadas con bacterias lácticas.....	151
4.1.4.2 Efecto de los FOS como compuestos protectores durante la deshidratación por convección forzada .....	151
4.1.4.3 Análisis estructural de las películas cargadas con bacterias.....	155
4.1.4.3.1 Microscopía electrónica de barrido .....	155
4.1.4.3.2 Espectroscopia FTIR.....	156
4.1.4.4 Propiedades físico-químicas de las películas cargadas con bacterias.....	157
4.1.4.4.1 Determinación de las isotermas de sorción de agua.....	157
4.1.4.4.2 Análisis del comportamiento termo-físico de las películas cargadas con bacterias.....	158

4.1.4.5 Almacenamiento de las películas cargadas con bacterias.....	161
4.1.5 CONCLUSIONES.....	165

**CAPÍTULO IV PARTE II. Funcionalización de un snack de manzana con *Lactobacillus plantarum* y FOS inmovilizados en películas de metilcelulosa**

4.II.1 INTRODUCCIÓN.....	169
4.II.1.1 Snacks como alimentos funcionales.....	170
4.II.1.2 Prebióticos como protectores de probióticos en el tracto gastrointestinal.....	171
4.II.1.3 Diseño de snacks funcionalizados con bacterias lácticas potencialmente probióticas.....	172
4.II.2 OBJETIVOS.....	175
4.II.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	177
4.II.3.1 Preparación del cultivo stock y condiciones de crecimiento.....	177
4.II.3.2 Preparación de la solución filmogénica.....	177
4.II.3.3 Preparación del snack de manzana.....	178
4.II.3.4 Propiedades fisicoquímicas de los snacks.....	178
4.II.3.4 .1 Determinación del contenido de humedad.....	178
4.II.3.4 .2 Análisis de textura.....	178
4.II.3.4 .3 Mediciones de color.....	179
4.II.3.5 Viabilidad bacteriana.....	179
4.II.3.6 Análisis de la microestructura mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	179
4.II.3.7 Propiedades térmicas.....	179
4.II.3.8 Análisis de las propiedades funcionales.....	179
4.II.3.8.1 Digestión in vitro.....	180
4.II.3.8.2 Análisis sensorial.....	180
4.II.3.9 Análisis estadístico.....	181
4.II.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	183
4.II.4.1 Proceso de secado del snack funcionalizado.....	183
4.II.4.2 Propiedades microbiológicas de los snacks funcionalizados.....	184

4.II.4.3 <i>Propiedades físicas, químicas y nutricionales de los snacks recubiertos</i> .....	187
4.II.4.4 <i>Propiedades estructurales y térmicas de los snacks</i> .....	189
4.II.4.5 <i>Microscopía electrónica de barrido (SEM) del snack funcionalizado</i> .....	190
4.II.4.6 <i>Panel Sensorial</i> .....	191
4.II.5 <b>CONCLUSIONES</b> .....	195
 <b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	 199
 <b>ANEXOS</b> .....	 205
Anexo A.1. <i>Permeabilidad al vapor de agua de las películas</i> .....	205
Anexo A.2. <i>Ensayos dinámicos</i> .....	207
Anexo A.3. <i>Análisis de textura</i> .....	209
Anexo A.4. <i>Análisis de color</i> .....	211
 <b>REFERENCIAS</b> .....	 213

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN GENERAL

**Figura 1.1.** Microscopía de campo claro de *Lactobacillus plantarum* aislado a partir de “Aloja”. Aumento: 1000 x, tinción de Gram. (**pag. 2**).

**Esquema 1.1.** Efectos dependientes de la microbiota intestinal sobre la fisiología del huésped, inducidos por el consumo de prebióticos y probióticos. (**pag. 7**).

**Figura 1.2.** Estructura de los fructanos presentes en la naturaleza producidos por plantas y microorganismos. (**pag. 8**).

### **CAPÍTULO I.** *Síntesis enzimática de Fructo-oligosacáridos monitoreada mediante espectroscopía FTIR y análisis multivariante. Efecto de la concentración de sustrato*

**Figura 1.1.** Estructura de los fructo-oligosacáridos obtenidos por síntesis enzimática a partir de sacarosa. (**pag. 24**).

**Figura 1.2.** Síntesis enzimática de FOS, mecanismo de reacción tipo ping-pong. (**pag. 25**).

**Figura 1.3.** Mecanismo general de transglicosilación. (**pag. 27**).

**Figura 1.4.** Diagrama de niveles de energía donde se muestran diferentes tipos de transiciones observables por espectroscopía de IR. (**pag. 29**).

**Figura 1.5.** Esquema simplificado de los principales modos vibracionales. (**pag. 30**).

**Figura 1.6.** Espectros IR de la maltosa, sacarosa y glucosa. (**pag. 32**).

**Figura 1.7.** Esquema general del Análisis de Componentes Principales (PCA) (Workman & Springsteen, 1989). (**pag. 34**).

**Esquema 1.1.** Esquema de trabajo para el estudio de la síntesis de FOS a partir de sacarosa y la puesta a punto del monitoreo por FTIR. (**pag. 45**).

**Figura 1.8.** Gráfico de PCA-scores (PC2 vs PC1) obtenidos del análisis de componentes principales de espectros vibracionales de dos especies bacterianas filogenéticamente relacionadas. (**pag. 36**).

**Figura 1.9.** Gráfico de *loadings* del análisis de PCA realizado en todo el rango del espectro (1800-800  $\text{cm}^{-1}$ ) de dos especies bacterianas relacionadas filogenéticamente. (**pag. 36**).

**Figura 1.10.** Porcentaje de conversión de sacarosa (X) en función del tiempo, obtenido a partir de diferentes concentraciones iniciales de sacarosa. (**pag. 48**).

**Figura 1.11.** Constante de decaimiento del sustrato (k) en función de la concentración de sacarosa inicial. (**pag. 49**).

**Figura 1.12.** Rendimiento de FOS totales (YFOS) en función del tiempo de síntesis, para diferentes concentraciones iniciales de sacarosa. (**pag. 50**).

**Figura 1.13.** Rendimiento (Y) de los oligosacáridos de cadena corta en función del tiempo de síntesis, a partir de diferentes concentraciones iniciales de sacarosa. (**pag. 51**).

**Figura 1.14.** Rendimiento (Y) de los monosacáridos en función del tiempo de síntesis, utilizando diferentes concentraciones iniciales de sacarosa. (**pag. 52**).

**Figura 1.15.** Espectros FTIR de la fructosa, glucosa, sacarosa, DP3, DP4 y DP5. (**pag. 54**).

**Figura 1.16.** Evolución de los espectros de FTIR a lo largo de la síntesis de FOS en la región 1200-900  $\text{cm}^{-1}$ . (**pag. 55**).

**Figura 1.17.** Valores predichos por los modelos PLS obtenidos a partir de los espectros FTIR en función de los valores de referencia obtenidos mediante HPLC de los productos de las reacciones enzimáticas. (**pag. 56**).

**Figura 1.18.** Comparación de las figuras 1.10 y 1.13A (conversión de sacarosa (X) y  $Y_{DP3}$  en función del tiempo para las diferentes concentraciones de sacarosa iniciales. (**pag. 61**).

## **CAPÍTULO II.** *Fructo-oligosacáridos como protectores frente a la deshidratación de Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

**Figura 2.1.** Determinación de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ). Termograma (Flujo de calor vs Temperatura). (**pag. 71**).

**Figura 2.2.** Equipo para la purificación de FOS. (**pag. 76**).

**Esquema 2.1.** Representación de los ensayos desarrollados para el estudio del efecto protector de los FOS. (**pag. 82**).

**Figura 2.3.** Temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ) de los azúcares estudiados a 11, 22 y 33 % HR. (**pag. 85**).

**Figura 2.4.** Fotografía de los viales conteniendo *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 liofilizado en presencia de soluciones 20 % p/v de los azúcares estudiados. (**pag. 86**).

**Figura 2.5.** Sondas fluorescentes (SYTO 9 y ioduro de propidio) para la determinación del daño de membrana. (**pag. 87**).

**Figura 2.6.** Cinética de acidificación del medio de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 liofilizado en presencia de los FOS obtenidos por síntesis. (**pag. 89**).

**Figura 2.7.** Caída de la viabilidad de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 liofilizado en función del tiempo de almacenamiento a 4 °C. (**pag. 90**).

**Figura 2.8.** Representación esquemática presentando el efecto de los FOS en cada parámetro evaluado (localizado en cada vértice del octógono). (**pag. 99**).

### **CAPÍTULO III.** *Secado de L. delbrueckii subsp. bulgaricus CIDCA 333 en microondas y vacío a escala piloto. Efecto de FOS como protectores*

**Figura 3.1.** Fermentador de acero inoxidable Biostat C Plus (Startorius, Alemania) de 15 L de capacidad. (**pag. 116**).

**Figura 3.2.** Cinéticas de acidificación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 en medio MRS. Efecto de la agitación. (**pag. 117**)

**Figura 3.3.** Cinéticas de acidificación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 en medio MRS. Efecto de la fuente de carbono (glucosa o lactosa). (**pag. 119**)

**Figura 3.4.** Cinéticas de acidificación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 en medio MRS. Efecto de la concentración de la fuente de carbono en el medio. (**pag. 120**)

**Figura 3.5.** Equipo de secado de microondas y vacío  $\mu$  VAC0150fd Puschner. (**pag. 122**)

**Figura 3.6.** Gráfico de Potencia de microondas de entrada (1 W/g), temperatura y humedad del producto en función del tiempo de secado. (**pag. 122**).

**Figura 3.7.** Contenido de agua residual (rwc) y actividad de agua ( $a_w$ ) de las muestras deshidratadas en microondas y vacío. (**pag. 124**).

**Figura 3.8.** Decaimiento logarítmico de la viabilidad ( $\text{Log}_{10}N/N_0$ ) en función de la concentración de FOS de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 luego de la deshidratación en microondas y vacío. (**pag. 125**).

### **CAPÍTULO IV.** *Prebióticos como protectores de bacterias lácticas inmovilizadas en matrices alimenticias no lácteas*

**Figura 4.1.** Esquema del proceso de gelificación de la metilcelulosa a través de las unidades hidrofóbicas efectivas. (**pag. 140**).

**Figura 4.2.** Preparación de películas de metilcelulosa cargadas con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 o *L. plantarum* CIDCA 83114. (**pag. 152**).

**Figura 4.3.** Viabilidad ( $\text{Log}_{10}N/N_0$ ) de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 y *L. plantarum* CIDCA 83114, inmovilizados en películas de metilcelulosa conteniendo diferentes concentraciones de FOS luego de la deshidratación en convección forzada. (**pag. 153**).

**Figura 4.4.** Microscopía electrónica de barrido de las películas cargadas con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 o *L. plantarum* CIDCA 83114. (**pag. 155**).

**Figura 4.5.** Espectro FTIR de las películas de metilcelulosa cargadas con *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* CIDCA 333 o *L. plantarum* CIDCA 83114. (**pag. 156**).

**Figura 4.6.** Relación entre el contenido de humedad de las películas de metilcelulosa cargadas y la viabilidad de los microorganismos ( $\text{Log}_{10}N/N_0$ ) durante el almacenamiento a 4 °C y diferentes HR. (**pag. 159**).

**Figura 4.7.** Efecto de la incorporación de FOS y/o bacterias en las propiedades mecánicas de las películas de metilcelulosa. (**pag. 160**).

**Figura 4.8.** Viabilidad de los microorganismos ( $\text{Log}_{10}N/N_0$ ) inmovilizados en las películas de metilcelulosa almacenadas durante 90 días a 4 °C a diferentes HRs. (**pag. 162**).

**Figura 4.9.** Pérdida de la viabilidad ( $\text{Log}_{10}N/N_0$ ) de *L. plantarum* CIDCA 83114 inmovilizado en una película de metilcelulosa sobre el snack de manzana luego del secado a diferentes temperaturas y tiempos. (**pag. 184**).

**Figura 4.10.** Snacks recubiertos con películas de metilcelulosa y *L. plantarum* CIDCA 83114. (**pag. 185**).

**Figura 4.11.** Pérdida de la viabilidad ( $\text{Log}_{10}N/N_0$ ) de *L. plantarum* CIDCA 83114 inmovilizado sobre el snack de manzana a diferentes tiempos de almacenamiento. (**pag. 186**).

**Figura 4.12.** Comportamiento mecánico (curvas de fuerza vs deformación) de los snacks de manzana recubiertos con películas de metilcelulosa cargadas con *L. plantarum* CIDCA 83114. (**pag. 188**).

**Figura 4.13.** Termogramas DSC de los snacks recubiertos con películas de metilcelulosa cargadas con *L. plantarum* CIDCA 83114. (**pag. 190**).

**Figura 4.14.** Microscopía electrónica de barrido de los snacks de manzana recubiertos con películas de metilcelulosa cargadas con *L. plantarum* CIDCA 83114 a diferentes resoluciones. (**pag. 191**).

**Figura 4.15.** Evaluación sensorial de los snacks de manzana. (**pag. 192**).

**Figura A.1.** Esquema de una celda de permeabilidad al vapor de agua. (*pag. 206*).

**Figura A.2.** Deformación oscilatoria de un material viscoelástico. (*pag. 207*).

**Figura A.3.** Equipo para el análisis de textura. (*pag. 210*).

**Figura A.4** Perfiles típicos de textura (esfuerzo vs deformación) de un material frágil y un material dúctil. (*pag. 210*).

## LISTA DE TABLAS

### INTRODUCCIÓN GENERAL

**Tabla I.1** Principales Cepas probióticas disponibles en el mercado. Adaptado de Ringel *et al.*, 2012. (**Pag. 3**).

### **CAPÍTULO I.** *Síntesis enzimática de Fructo-oligosacáridos monitoreada mediante espectroscopía FTIR y análisis multivariante. Efecto de la concentración de sustrato*

**Tabla 1.1.** Enzimas de las familias GH32 y GH68 - Origen y tipo de actividad enzimática. Adaptado de Arrizón *et al.* (2014). (**Pag. 26**).

**Tabla 1.2.** Conversión máxima de sacarosa ( $X_{max}$ ) para las concentraciones iniciales de sacarosa ensayadas en la síntesis enzimática de FOS. (**pag. 49**).

### **CAPÍTULO II.** *Fructo-oligosacáridos como protectores frente a la deshidratación de Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

**Tabla 2.1.** Composición de los FOS (% p/p) obtenidos por síntesis enzimática a partir de sacarosa 40 % p/v usando *Viscozyme L* como biocatalizador. (**pag. 83**).

**Tabla 2.2.** Composición de los FOS (% p/p) usados como protectores. (**pag. 83**)

**Tabla 2.3.** Temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ) de las mezclas de FOS y de la sacarosa a diferentes humedades relativas (HRs). (**pag. 84**).

**Tabla 2.4.** Logaritmos de UFC/mL y permeabilidad al yoduro de propidio (PI) después de la liofilización de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 en presencia de FOS o sacarosa 20 % p/v. (**pag. 86**).

**Tabla 2.5.** Parámetros cinéticos de acidificación del medio de cultivo para *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 luego de la deshidratación por liofilización en presencia de FOS o sacarosa. (**pag. 88**).

**Tabla 2.6.** Logaritmos de UFC/mL de los microorganismos antes y después de liofilizar en presencia de FOS y después de la humidificación a diferentes HR. (**pag. 91**).

**CAPÍTULO III.** *Secado de L. delbrueckii subsp. bulgaricus CIDCA 333 en microondas y vacío a escala piloto. Efecto de FOS como protectores*

**Tabla 3.1.** Parámetros cinéticos de Fermentación. Estudio de la agitación en la fermentación a escala piloto de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333. (**pag. 118**).

**Tabla 3.2.** Parámetros cinéticos de Fermentación. Estudio de la fuente de carbono en la fermentación a escala piloto de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333. (**pag. 120**).

**Tabla 3.3.** Condiciones de crecimiento optimizadas para *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 a escala piloto (**pag. 121**).

**Tabla 3.4.** Deshidratación de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 mediante microondas y vacío a escala piloto. Cantidad de FOS adicionada cada 25 g de muestra. (**pag. 123**).

**Tabla 3.5.** Deshidratación de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 mediante microondas y vacío a escala piloto. Contenido de agua residual (rwc) y  $a_w$  de las muestras deshidratadas en presencia de FOS. (**pag. 123**).

**CAPÍTULO IV.** *Prebióticos como protectores de bacterias lácticas inmovilizadas en matrices alimenticias no lácteas*

**Tabla 4.1.** Parámetros de las ecuaciones de GAB e Iglesias (Ec. (4.1) y (4.2) en el texto). (**pag. 148**).

**Tabla 4.2.** Constantes de inactivación  $k$  de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 y *L. plantarum* CIDCA 83114 en películas de metilcelulosa conteniendo FOS almacenadas a diferentes HRs y 4 °C. (**pag. 163**).

**Tabla 4.3.** Contenido de humedad, color y parámetros mecánicos de los *snacks* de manzana recubiertos con películas de metilcelulosa cargadas con *L. plantarum* CIDCA 83114 y almacenados durante 90 días. (**pag. 187**).



# INTRODUCCIÓN GENERAL

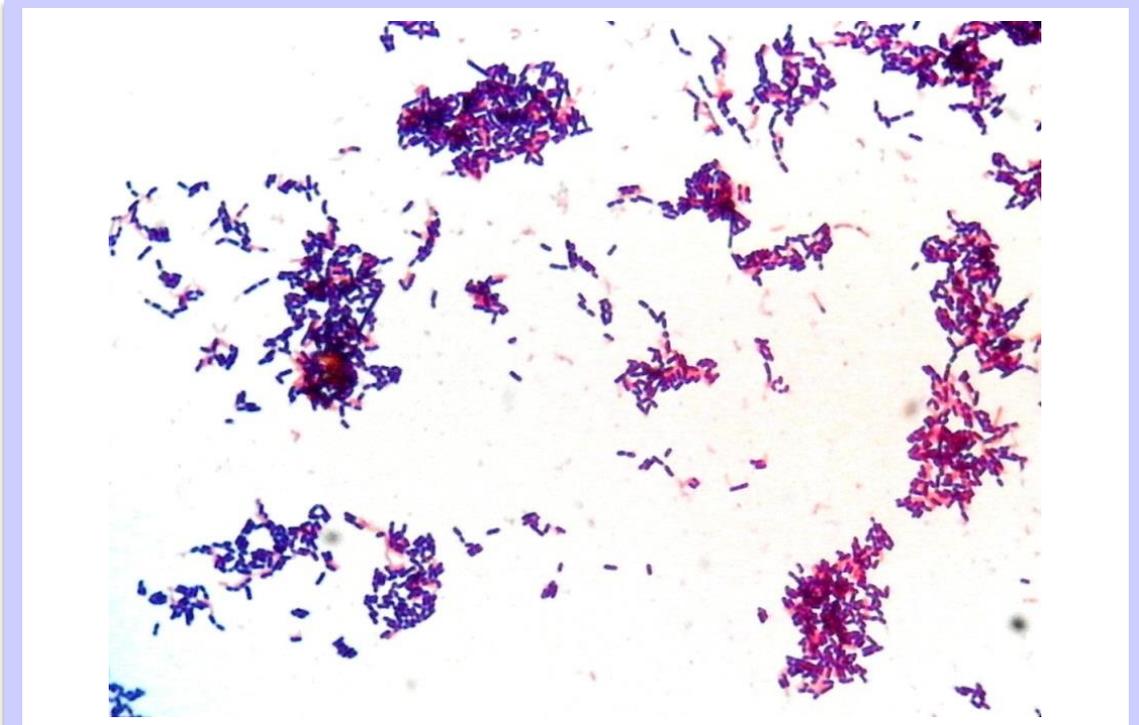
## Las bacterias lácticas

Las bacterias lácticas constituyen un grupo de microorganismos que incluye cocos o bacilos GRAM positivos no esporulados (Figura 1.1), no móviles, anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes, oxidasa y catalasa negativas (Carr *et al.*, 2002). Además, carecen de citocromos y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos y son ácido tolerantes, pudiendo crecer a valores bajos de pH ( $\text{pH} \leq 4$ ). Entre los principales géneros de bacterias ácido lácticas se encuentran: *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (König *et al.*, 2009). Algunos autores incluyen también al género *Bifidobacterium*. Sin embargo, este género es diferente tanto desde el punto de vista filogenético como desde el punto de vista bioquímico (König *et al.*, 2009).

Las bacterias lácticas en general, y los lactobacilos en particular, juegan un papel importante en la salud y el bienestar humano y animal. Fueron consideradas por la FDA (Food and Drug Administration de Estados Unidos) como GRAS (*Generally Recognized as Safe*, Generalmente reconocidos como seguros) y su empleo en alimentos se encuentra reglamentado en nuestro país por el Código Alimentario Argentino (CAA, Art. 1390, Año 2012).

Son los microorganismos más ampliamente utilizados como *starters* en la industria, en la fabricación de varios alimentos como queso, yogurt, carnes fermentadas, pescado y vegetales, y

también como inoculantes para ensilados (Albano *et al.*, 2009; Gerez *et al.*, 2009; Giraffa *et al.*, 2010).



**Figura I.1.** Microscopía de campo claro de *Lactobacillus plantarum* aislado a partir de “Aloja”, una bebida fermentada a base de frutos de algarroba originaria del noroeste Argentino. Aumento: 1000 x, tinción de Gram.

## Probióticos

Desde tiempos antiguos los alimentos que contienen microorganismos vivos han sido usados para mantener o restablecer la salud (Sánchez *et al.*, 2016). En una versión del Antiguo Testamento se atribuye la longevidad de Abraham al consumo de leche ácida (Schrezenmeir & Vrese, 2001). Sin embargo, fue sólo varios siglos más tarde cuando el premio Nobel Élie Metchnikoff introdujo la idea de que el consumo de microorganismos vivos benéficos podría desplazar organismos putrefactivos y patogénicos del intestino y aumentar la longevidad [“The Prolongation of Life: Optimistic Studies”; Metchnikoff (1908)]. Ésta podría ser considerada la primera referencia de la definición actual de un probiótico. Al respecto, en el año 2013 la Asociación Internacional para Probióticos y Prebióticos (ASAPP) definió como probiótico a los microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped (Hill *et al.*, 2014). Éstos actúan mejorando o restableciendo las características del microbioma intestinal (Tabbers & Benninga, 2007).

Una gran parte de las cepas que se emplean como probióticos pertenecen al género *Lactobacillus*. Los lactobacilos son comensales de los humanos y han sido aplicados históricamente de forma segura en la fermentación de alimentos, aspectos que garantizarían *a priori* su inocuidad. Sin embargo, a pesar de que estas bacterias se consideran seguras (GRAS), se recomienda que sean sometidas a pruebas que garanticen que su aplicación no afecte negativamente la salud del hospedador (Romanin *et al.*, 2010; Carasi *et al.*, 2014). Además, son utilizadas como probióticos un gran número de bacterias y levaduras pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Saccharomyces* (Shah, 2007).

En la Tabla I.1 se listan los principales probióticos comerciales utilizados actualmente en Europa, Estados Unidos y Canadá (Ringel *et al.*, 2012).

**Tabla I.1** Cepas probióticas disponibles en el mercado.

<b>Cepa</b>	<b>Distribuidor</b>	
<i>Lb. acidophilus</i> NCFM	DuPont Nutrition Biosciences ApS (Madison WI, USA)	
<i>Bif. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bi-07		
<i>Bif. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 (DR10)		
<i>Lb. rhamnosus</i> HN001 (DR20)		
<i>Saccharomyces cerevisiae boulardii</i>	Biocodex (Creswell OR, USA)	
<i>Bif. infantis</i> 35264	Procter & Gamble (Mason OH, USA)	
<i>Lb. rhamnosus</i> R0011		
<i>Lb. acidophilus</i> R0052	Lallemand (Montreal, Canada)	
<i>Bif. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12	Chr. Hansen (Milwaukee WI, USA)	
<i>Lb. acidophilus</i> LA5		
<i>Lb. paracasei</i> CRL 431		
<i>Lb. fermentum</i> VRI003 (PCC)		
<i>Lb. reuteri</i> RC-14		
<i>Lb. rhamnosus</i> GR-1		
<i>Lb. paracasei</i> F19		
<i>Lb. casei</i> Shirota		Yakult (Tokyo, Japón)
<i>Bif. breve</i> cepa Yakult		
<i>Lb. casei</i> DN-114 001 ( " <i>L. casei</i> Immunitas")		Danone (Paris, Francia)
<i>Bif. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> DN-173 010 (" <i>Bifidus regularis</i> ")	Dannon (Tarrytown, NY, USA)	
<i>Lb. johnsonii</i> Lj-1 (NCC533; <i>L. acidophilus</i> La-1)	Nestlé (Lausanne, Suiza)	
<i>Lb. plantarum</i> 299V		
<i>Lb. rhamnosus</i> 271	Probi AB (Lund, Suecia)	
<i>Lb. reuteri</i> ATCC 55730 (" <i>Protectis</i> ")	NextFoods (Boulder, CO, USA)	
<i>Lb. rhamnosus</i> GG (" <i>LGG</i> ")	Biogaia (Stockholm, Suecia)	
<i>Lb. rhamnosus</i> LB21	Valio Dairy (Helsinki, Finlandia)	
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	Essum AB (Umeå , Suecia)	
<i>Lb. salivarius</i> UCC118	University College (Cork, Irlanda)	
<i>Bif. longum</i> BB536	Morinaga Milk Industry Co., Ltd. (Zama-City, Japón)	
<i>Lb. acidophilus</i> LB		
<i>Bacillus coagulans</i> BC30	Lactéol Laboratory (Houdan, Francia)	
	Ganeden Biotech Inc. (Cleveland, OH, USA)	

### Beneficios atribuidos al consumo de probióticos

Los principales beneficios atribuidos al consumo de probióticos incluyen una mayor resistencia a infecciones, reducción del colesterol sérico, reducción de la concentración de sustancias tóxicas a nivel intestinal, competencia favorable con microorganismos patógenos, producción de vitaminas (*e.g.*, vitaminas del grupo B tales como folatos, riboflavina y vitamina B12), entre otros (Nemcová, 1997; Patel & Goyal, 2012).

Al nivel de la mucosa intestinal, los probióticos han demostrado ejercer efectos benéficos a diferentes niveles (Shreiner *et al.*, 2015) principalmente sobre la barrera epitelial, aumentando la expresión/secreción de mucinas por las células caliciformes (así limitando el movimiento de las bacterias a través la capa de *mucus*), aumentando la producción de péptidos antimicrobianos (*e.g.*,  $\beta$ -defensinas), o reforzando la estabilidad de las uniones estrechas, y por lo tanto restringiendo la permeabilidad epitelial a patógenos intraluminales y toxinas. Los probióticos también actúan sobre la inmunidad de la mucosa intestinal mediante el incremento de los niveles de células productoras de IgA en la lámina propia y promoviendo la secreción de IgA en la capa de *mucus* luminal, actividades que limitan la colonización por bacterias patógenas.

El uso de probióticos se ha estudiado en diferentes patologías: diarrea infecciosa, patologías relacionadas con la inflamación del intestino, síndrome de intestino irritable, infección por *Helicobacter pylori*, intolerancia a la lactosa y diabetes, entre otras (Ringel *et al.*, 2012).

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

## El microbioma intestinal

Todos los organismos, desde los más simples como los nematodos hasta los más complejos como los humanos, coexisten con una población dinámica de microorganismos. Esta asociación puede ser parasítica, comensalística o mutualística. La naturaleza de esta interacción puede cambiar a lo largo del tiempo, dependiendo del hospedador o de factores ambientales. En el caso de los seres humanos, un conjunto complejo de microorganismos, según estimaciones más de  $10^{18}$  células (Bindels *et al.*, 2015), constituido principalmente por bacterias y en menor medida por *archeas*, hongos y protozoos, conforman la **microbiota intestinal**, y las interacciones entre éstos y con el huésped constituyen el **microbioma intestinal**. La interacción entre los integrantes de la microbiota intestinal se pone de manifiesto en el proceso de fermentación colónica, en el cual se suceden numerosas interacciones nutricionales entre diferentes especies, cada una con un nicho ecológico y actividades metabólicas especializadas (Shreiner *et al.*, 2015). Los microorganismos del intestino que son incapaces de degradar carbohidratos de estructuras complejas de manera directa, crecen por **alimentación cruzada** empleando metabolitos o fragmentos de macromoléculas generados por el metabolismo de otros microorganismos. En el caso de los polisacáridos complejos, son primero

fermentados por especies fibrolíticas que incluyen géneros tales como *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Clostridium* grupos IV y XIVa (incluyendo los géneros *Faecalibacterium* y *Roseburia*). Por su parte, las bacterias glicolíticas crecen en azúcares más simples e incluyen géneros como *Lactobacillus*, *Escherichia* o *Enterococcus* (Shreiner *et al.*, 2015)

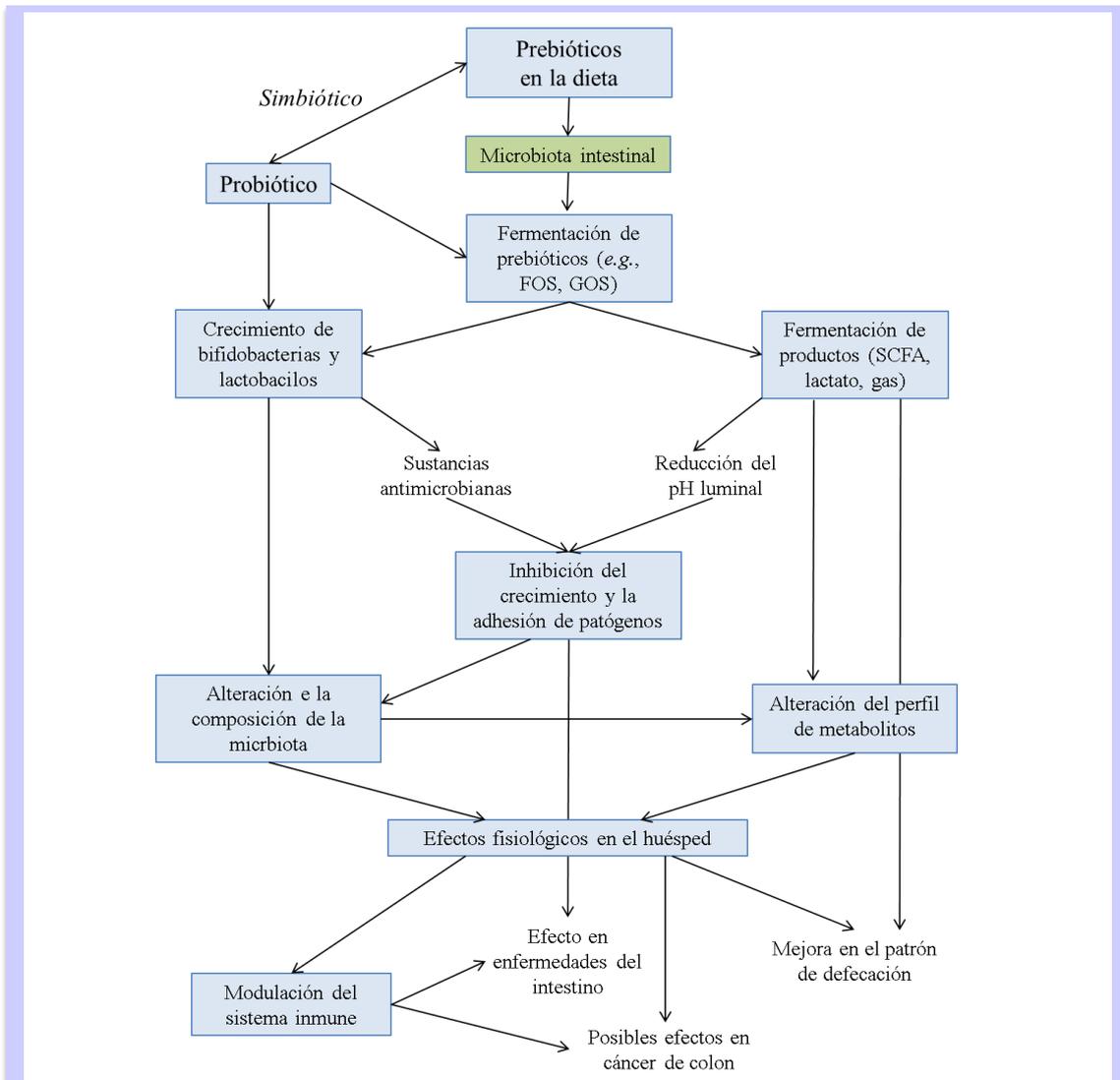
En cuanto a las interacciones con el huésped, el microbioma intestinal influye en un amplio rango de procesos fisiológicos, incluyendo la digestión, el desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa, el funcionamiento del sistema endocrino gastrointestinal, la producción de nutrientes esenciales y la resistencia contra patógenos, entre otras funciones relevantes (Bindels *et al.*, 2015). La idea de modular el microbioma intestinal para mejorar la salud fue propuesta hace más de un siglo (Metchnikoff, 1908) y actualmente se cuenta con un grupo de herramientas terapéuticas para tal fin, que van desde el trasplante completo de la microbiota fecal hasta la inclusión de microorganismos individuales o consorcios de éstos (probióticos) en la microbiota intestinal (Sánchez *et al.*, 2016). Otra importante herramienta es la provisión de sustratos que estimulen el crecimiento de algunos de los microorganismos del microbioma y así inducir cambios en la composición y el metabolismo (Krumbeck *et al.*, 2016).

## **Prebióticos**

Los prebióticos han sido definidos como componentes alimenticios no digeribles que afectan benéficamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, mejorando así la salud del huésped. Por lo tanto, la ingestión de ingredientes alimenticios con propiedades prebióticas demostradas puede modular positivamente el microbioma intestinal confiriendo un efecto benéfico en la fisiología del huésped (*e.g.*, mediante el aumento de la diversidad de la microbiota, producción de ácidos grasos de cadena corta, etc.) (Gibson & Roberfroid, 1995). Esta definición incluye a todos los carbohidratos no digeribles que mejoran la salud a través de la modulación del microbioma intestinal (Bindels *et al.*, 2015). En este contexto, se define el término “**efecto prebiótico**” como la respuesta que surge de la modulación de la composición y/o la actividad de la microbiota intestinal a través de la metabolización de compuestos no digeribles, que por su composición o función primaria no cumplen los requerimientos para ser considerados prebióticos. Esto incluye compuestos tales como: fibra dietaria, los oligosacáridos de la leche materna y los granos enteros (Neyrinck *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2013; Slavin *et al.*, 2013; Viaud *et al.*, 2013; Tachon *et al.*, 2013; Trompette *et al.*, 2014; Hamaker *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Pacheco *et al.*, 2014).

Entre los compuestos con propiedades prebióticas conocidas pueden mencionarse los fructo-oligosacáridos (FOS), los polifruktanos, la inulina, los galactooligosacáridos (GOS) y la lactulosa. Existen otros compuestos cuyas propiedades prebióticas no han sido probadas de manera rigurosa aún, tales como la lactosacarosa, los xilooligosacáridos o los isomaltooligosacáridos (Lee *et al.*, 2009). De todos estos compuestos, los GOS y los FOS han sido los más estudiados en cuanto a su capacidad prebiótica (Brownawell *et al.*, 2012). Existen evidencias claras de que los FOS estimulan poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos presentes tanto en la mucosa como en el lumen del colon proximal y distal (Kralj *et al.*, 2008).

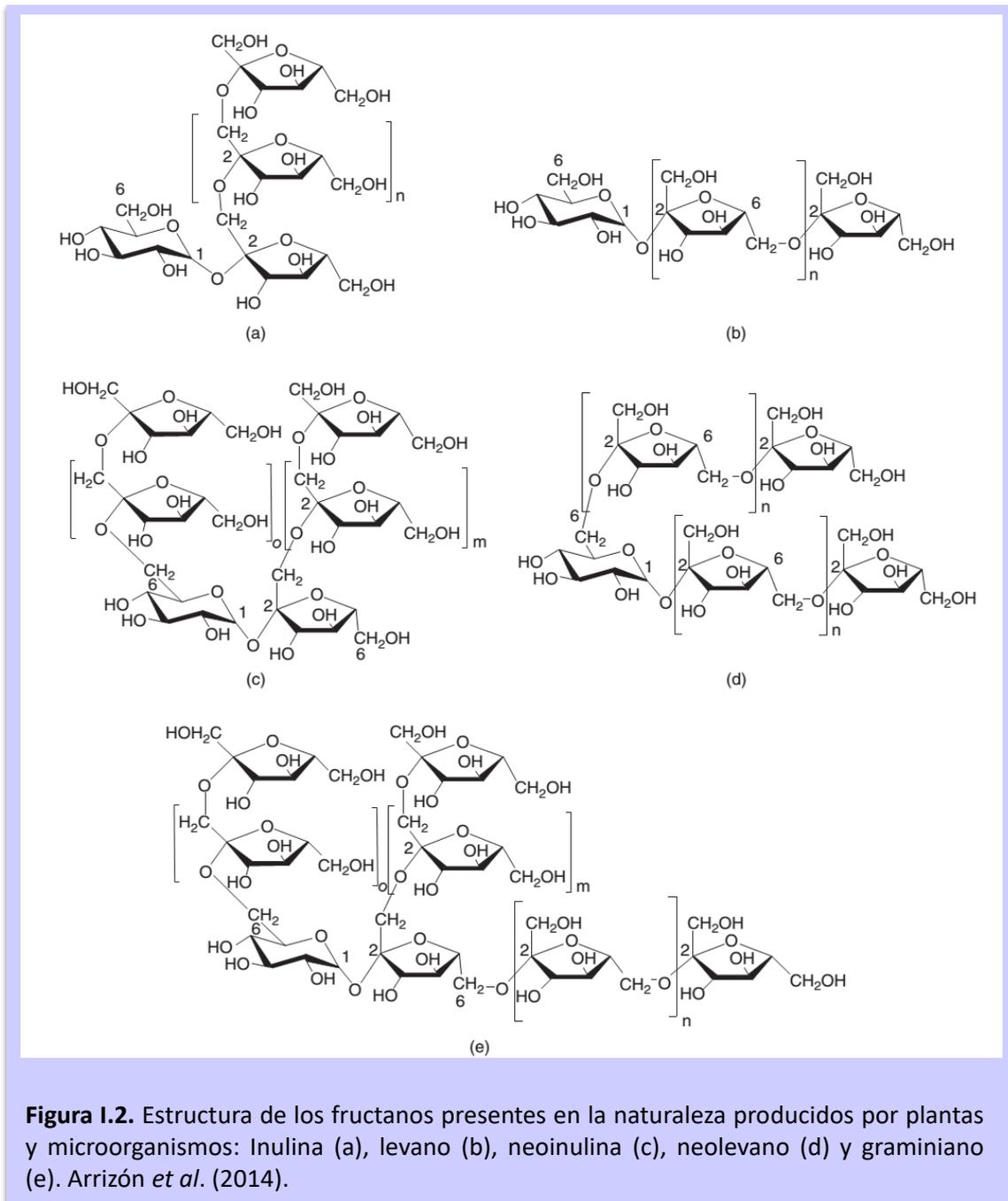
Los ácidos grasos de cadena corta, el principal producto de fermentación de los carbohidratos prebióticos, son considerados los metabolitos pilares de su efecto benéfico (Steinert *et al.*, 2016). El butirato es una fuente de energía primaria para los colonocitos, el propionato regula la síntesis de colesterol en el hígado, y el acetato controla la lipogénesis hepática y es usado para generar ATP en el tejido muscular (Shreiner *et al.*, 2015). Adicionalmente, los ácidos grasos de cadena corta regulan el pH intestinal, inhibiendo patógenos y poseen actividad antimicrobiana (Meyer & Stasse-Wolthuis, 2009). Se especula que éstas y otras funciones se traducen en un número de beneficios clínicos, incluyendo la reducción de infecciones causadas por *C. difficile* (Steinert *et al.*, 2016), el mejoramiento de los síntomas del grupo de enfermedades inflamatorias del intestino (enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, entre otras), la reducción de la diarrea infecciosa y la represión de síntomas de alergia (Steinert *et al.*, 2016). Asimismo, investigaciones recientes sugieren una conexión entre los ácidos grasos de cadena corta y varios parámetros asociados con síndromes metabólicos, tales como el control de la ingesta de alimentos y el peso corporal, la homeostasis de la glucosa, ya sea de manera directa a través de vías hipotalámicas, o de manera indirecta vía secreción intestinal de hormonas como péptido similar al glucagón tipo 1 y péptido YY (DiBaise *et al.*, 2012). En el esquema I.1 se representa una cascada de efectos fisiológicos que pueden ser inducidos por el consumo de prebióticos tales como los FOS, de bacterias probióticas o la combinación de ambos (**simbióticos**).



**Esquema I.1.** Efectos dependientes de la microbiota intestinal sobre la fisiología del huésped, inducidos por el consumo de prebióticos y probióticos. SCFA, ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato, butirato). Adaptado de Vos *et al.*, (2007).

### Fructanos como prebióticos

Los fructanos son moléculas de  $\beta$ -fructosil-fructosa producidas por un amplio rango de bacterias, levaduras u hongos y están naturalmente presentes en muchas plantas, pero no han sido descritos en el reino animal (Arrizón *et al.*, 2014). Se sintetizan a partir de sacarosa como aceptor primario, y por lo tanto presentan un residuo común de glucosa. Los diferentes tipos de fructanos difieren en la posición de los enlaces  $\beta$ -glicosídicos donde las unidades de fructosa son polimerizadas. La presencia de ramificaciones y el número de residuos por molécula (grado de polimerización, DP) se muestran en la Figura I.2.



De acuerdo a la posición de los enlaces  $\beta$ -glucosídicos se los puede clasificar en:

- inulinas**: tienen uniones  $\beta$ 2-1 entre los residuos de fructosa y su forma de menor peso molecular es la 1-kestosa [Figura I.2 (a)];
- levanos**: tienen uniones  $\beta$ 2-6 entre los residuos de fructosa y se encuentran en disposición lineal [Figura I.2 (b)];
- neoinulinas**: tienen uniones  $\beta$ 2-1 en arreglos lineales pero con unidades de glucosa intercaladas entre los restos de fructosa [Figura I.2x (c)];

-**neolevanos**: tienen unidades de fructofuranosa con uniones  $\beta$ 2-1 y  $\beta$ 2-6 tanto en el terminal como en el medio de la molécula de sacarosa (neokestosas) [Figura I.2 (d)].

-**graminanos**: pueden tener uniones del tipo inulina o levano pero siempre con una o más ramificaciones cortas [Figura I.2 (e)];

Los fructanos del tipo inulina son conocidos como fructo-oligosacáridos (FOS), y sus propiedades prebióticas fueron descritas en la sección anterior. Se sabe que varios fructanos de tipo inulina actúan como protectores naturales contra la deshidratación en plantas (Valluru & van der Ende, 2008). De hecho, no es sorprendente que se acumulen en plantas expuestas a ambientes fríos y secos, y estén ausentes en plantas de ambientes acuáticos y tropicales. En este sentido, diferentes grupos de investigación arribaron a conclusiones similares sobre el rol protector de los fructanos y otros azúcares en la deshidratación de membranas modelo. Hinch *et al.* (2000) analizaron el efecto de la inulina (DP promedio 15) extraída a partir de raíces de achicoria y tubérculos de dahlia sobre la estabilización de liposomas preparados a partir de fosfatidilcolina de huevo deshidratados mediante liofilización. Los autores observaron una interacción directa del polisacárido con las cabezas polares de los fosfolípidos, que se evidenció en una disminución de la temperatura de transición de fase de membrana ( $T_m$ ). Este efecto se vio reforzado con la adición de glucosa. Por el contrario, los liposomas liofilizados en presencia de hidroxietil almidón no tuvieron un efecto significativo sobre la  $T_m$  (Hinch *et al.*, 2000). Hinch *et al.* (2003) llevaron a cabo un estudio sistemático sobre el efecto de azúcares con grado de polimerización creciente de la familia de la rafinosa [sacarosa (DP2), rafinosa (DP3), estaquiosa (DP4) y verbascosa (DP5)] en la estabilización de liposomas preparados a partir de fosfatidilcolina. En dicho sistema la estabilización se explicó sobre la base de la mayor capacidad de azúcares con mayores DP para interactuar con las membranas lipídicas, y también a su mayor temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) (Hinch *et al.*, 2003).

### **Preservación de bacterias lácticas y probióticos**

Los cultivos probióticos para aplicación en alimentos son generalmente distribuidos en forma deshidratada, como cápsulas o polvos (Ross *et al.*, 2005). Asimismo, es necesario tener en cuenta que cuando estos microorganismos son vehiculizados en matrices alimenticias, tanto la matriz como el proceso tecnológico pueden ser perjudiciales. Por ello, la protección de bacterias lácticas debe también contemplar estos procesos.

El empleo de *starters* en procesos de fermentación o en alimentos funcionales requiere de la provisión de microorganismos viables. Una alta viabilidad microbiana se reflejará en mayor actividad metabólica, y por lo tanto, mejores rendimientos de fermentación. En aquellos productos que

incorporen cepas probióticas en su composición, la viabilidad inicial del microorganismo determinará la supervivencia bacteriana durante el procesamiento y la vida útil del producto durante el almacenamiento. Por tal motivo la elección de métodos adecuados de preservación es un factor determinante para garantizar la viabilidad bacteriana durante el proceso y el almacenamiento. El manejo de cultivos líquidos o congelados resulta poco práctico y genera grandes gastos de transporte y almacenamiento, sin mencionar la pérdida de viabilidad de los microorganismos en medio líquido. Generalmente, los cultivos probióticos para aplicación en alimentos son distribuidos en forma deshidratada, como cápsulas o polvos (Ross *et al.*, 2005), siendo la liofilización y el secado en *spray* los métodos más empleados para este fin (Meng *et al.*, 2008; Morgan *et al.*, 2006)

Durante los procesos de preservación mencionados, el descenso de la actividad acuosa es la principal causa de daño sobre las estructuras bacterianas, siendo la membrana celular el primer blanco de daño (Tymczyszyn *et al.*, 2008). El daño causado por la deshidratación generalmente afecta la barrera de permeabilidad de iones, alterando las propiedades fisicoquímicas de la membrana y en consecuencia provocando una disminución de la viabilidad bacteriana. Para evitar estos daños la adición de agentes protectores es de suma importancia. Estos agentes protectores son “solutos compatibles”, e incluyen aminoácidos (*e.g.*, glutamato, prolina, betaína, glicina) y azúcares (*e.g.*, trehalosa, lactosa, sacarosa, etc.). Debido a su alta efectividad, los azúcares de grado alimenticio son los más usados en la preservación de microorganismos. La capacidad protectora de los azúcares trasciende la protección de microorganismos, ya que también actúan como protectores de otras biomoléculas (*e.g.*, proteínas, enzimas), de liposomas y de productos farmacéuticos (Oldenhof *et al.*, 2005; Santivarangkna *et al.*, 2008; Payton *et al.*, 2014). Al respecto, se propuso dos hipótesis que explican la capacidad protectora de los azúcares de acuerdo a su estructura química:

- Reemplazo de moléculas de agua
- Vitrificación

### **Hipótesis de reemplazo de moléculas de agua**

Los grupos polares de las macromoléculas presentes en la célula están unidos a moléculas de agua mediante enlaces hidrógeno. Las moléculas de agua juegan un papel fundamental manteniendo la integridad de las estructuras y el funcionamiento correcto de la bicapa lipídica y la estructura terciaria de las proteínas (Milhaud, 2004; Beck *et al.*, 2007). Este rol del agua explica por qué las biomoléculas pierden su función biológica luego de la deshidratación. La mayoría de los procesos empleados para la preservación (*e.g.*, liofilización, secado por *spray*) llevan a la deshidratación de lípidos y proteínas.

En el caso de los lípidos de membrana, pueden existir en fase gel o en fase líquido-cristalino. La temperatura a la que ocurre la transición de una fase a la otra se conoce como temperatura de fusión o de transición de fase ( $T_m$ ). Cuando la temperatura se encuentra por debajo de la  $T_m$ , la bicapa se encuentra en estado de gel, y cuando está por encima de dicha temperatura, se encuentra en estado líquido-cristalino (Mateos, 2011). Cuando está hidratada, la membrana se encuentra en estado líquido-cristalino. Contrariamente, la pérdida de agua durante los procesos de preservación produce la disminución del espacio lateral entre las cabezas polares y entre las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos de membrana. Esto provoca un aumento de la  $T_m$  (disminución de la fluidez), alterando las propiedades de barrera de la bicapa. En estado anhidro, los lípidos se empaquetan de manera compacta, debido a la pérdida de agua de hidratación de los grupos polares. Esto incrementa las interacciones de van de Waals entre las cadenas hidrocarbonadas y la  $T_m$  (Ricker *et al.*, 2003). Debido al empaquetamiento más compacto de los lípidos de membrana, la membrana queda más susceptible a la lisis (Cyril *et al.*, 2002). Los compuestos polihidroxilados pueden evitar el empaquetamiento de lípidos y la desnaturalización de proteínas en el estado anhidro debido a su capacidad de establecer enlaces de hidrógeno con estas estructuras. Varias investigaciones biofísicas demostraron que la presencia de disacáridos durante la deshidratación y el almacenamiento de liposomas previenen el *leakage* y la fusión (Crowe *et al.*, 1998; Oldenhof *et al.*, 2005).

Azúcares como la trehalosa o la sacarosa interactúan directamente con las membranas lipídicas en el estado deshidratado reemplazando moléculas de agua. Como consecuencia de esta interacción se produce un descenso en la  $T_m$ , lo que permite mantener la estructura y la permeabilidad selectiva de la membrana, al igual que en el estado hidratado (Crowe *et al.*, 1992, 1998).

La efectividad de la interacción de oligo- y polisacáridos con lípidos de membrana depende en gran medida de la flexibilidad de su estructura, la cual a su vez está directamente relacionada con el grado de polimerización (DP). Así, la rafinosa (DP3) es más efectiva que la trehalosa, y ésta, más efectiva que la glucosa en el descenso de la  $T_m$  de membranas de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) (Crowe *et al.*, 1998). Hinchá *et al.* (2003) llevaron a cabo un estudio sistemático sobre el efecto de azúcares de la serie de la rafinosa en la estabilización de membranas de fosfatidilcolina de huevo. Este estudio incluyó la sacarosa (DP2), rafinosa (DP3), estaquiosa (DP4) y verbascosa (DP5), y en él se observó que estos azúcares previenen la fusión y el *leakage* de los liposomas progresivamente mejor a medida que aumenta el DP. Esta estabilización se explicó en base a la mayor capacidad de los oligosacáridos de mayor DP para interactuar con las membranas lipídicas (disminuyendo la  $T_m$ ) (Hinchá *et al.*, 2003). En otro estudio sistemático, Cancela & Hinchá (2006) analizaron el efecto de oligosacáridos de diferentes familias (fructanos, malto-oligosacáridos y mano-oligosacáridos) durante la deshidratación de liposomas por liofilización. Ellos concluyeron que cuando las

estructuras son flexibles, el efecto negativo del impedimento estérico debido al aumento del DP, se contrarresta por la elasticidad de la estructura. Esto sustenta el hecho de que la inulina obtenida de achicoria y dalia (DP entre 10 a 30) y los levanos de alto peso molecular (DP > 25000) son capaces de establecer una interacción directa con liposomas, estabilizándolos durante la liofilización (Hincha *et al.*, 2000; Vereyken *et al.*, 2001). La tendencia de la inulina a formar estructuras *random coil* y la de los levanos de formar estructuras  $\alpha$ -hélices explica la mayor interacción de las membranas con la inulina que con los levanos. De modo similar, el polisacárido dextrano (unidades ramificadas de  $\alpha$ -glucosa) interacciona en menor medida con fosfolípidos (Vereyken *et al.*, 2003a).

Con respecto al incremento del DP, los fructanos son más efectivos que los gluco-oligosacáridos en la estabilización de liposomas deshidratados debido a su capacidad para interactuar con las cabezas de los grupos polares de los lípidos y disminuir la  $T_m$  (Vereyken *et al.*, 2001, 2003b; Hincha *et al.*, 2002; Ananta *et al.*, 2005; Santivarangkna *et al.*, 2008).

Es necesario señalar que aunque la hipótesis del reemplazo de moléculas de agua ha sido ampliamente usada para explicar el efecto protector de los azúcares sobre las membranas lipídicas, ésta también puede explicar el efecto protector de dichos compuestos sobre enzimas termolábiles y polipéptidos durante la liofilización (Carpenter *et al.*, 1987; Carpenter & Crowe, 1989a; Oldenhof *et al.*, 2005). De hecho, mediante el uso de espectroscopia de infrarrojo, se observó que en presencia de azúcares, las bandas amida I son similares para proteínas hidratadas y deshidratadas. Además, los modos vibracionales correspondientes a los estiramientos de los grupos OH de los azúcares se desplazan hacia menores números de onda en presencia de proteínas, lo que confirma la interacción azúcar-proteína (Carpenter & Crowe, 1989b; Crowe *et al.*, 1993; Allison *et al.*, 1999; Pikal Cleland & Carpenter, 2001; Imamura *et al.*, 2003). Esto sustenta la capacidad de los azúcares para establecer enlaces de hidrógeno con los grupos polares y cargados de las proteínas, reemplazando moléculas de agua y contribuyendo así a la preservación de la estructura nativa en el estado deshidratado (Allison *et al.*, 1999).

### **Hipótesis de vitrificación**

Los compuestos polihidroxilados son capaces de formar vidrios (sólidos amorfos) en ciertas condiciones. Los vidrios son líquidos superenfriados con una viscosidad muy alta donde los movimientos rotacionales y vibracionales son extremadamente lentos, y las reacciones químicas están restringidas (Lodato *et al.*, 1999; Tymczynsyn *et al.*, 2011, 2012; Golowczyc *et al.*, 2013). Estas condiciones aseguran el almacenamiento de productos deshidratados por largos períodos, manteniendo las propiedades biológicas. La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) es el rango de temperaturas a las cuales un material amorfo pasa de un estado vítreo (de alta densidad) a un

estado *rubbery* (de menor densidad). La  $T_g$  se asocia a una transición de segundo orden que puede determinarse como un cambio en la capacidad calorífica.

Para una preservación adecuada, los materiales biológicos deben ser conservados en estado amorfo, esto es, a temperaturas por debajo de la  $T_g$  (Higl *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2008). Por encima de la  $T_g$  (estado *rubbery*), la movilidad molecular aumenta y muchos de los compuestos amorfos cristalizan. Por lo tanto, las temperaturas de transición vítrea altas dificultan la cristalización y son deseables para la estabilización de productos que contienen carbohidratos durante el almacenamiento.

Los valores de  $T_g$  presentan una fuerte dependencia con el contenido de agua de la muestra. Los plastificantes, sustancias que aumentan la plasticidad o fluidez de un material (*e.g.*, el agua), causando un fuerte descenso en la  $T_g$  (Roos, 1995), y llevando a reacciones de deterioro y pérdida de actividad biológica. Los valores de  $T_g$  son específicos para cada carbohidrato o mezcla de carbohidratos, y proporcionales a su peso molecular (Roos, 1993, 1995; Shrestha *et al.*, 2007), tal como se informó para la glucosa y los homopolímeros de aldohexosas [maltodextrinas y galactooligosacáridos (GOS) (Shrestha *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2011).

Para asegurar una mayor estabilidad en productos deshidratados, la temperatura de almacenamiento ( $T$ ) debería estar por debajo de la  $T_g$ , y lo más alejada posible de ésta. Se define entonces el parámetro  $T-T_g$ , que permite determinar la capacidad de un determinado compuesto para actuar como protector a lo largo del tiempo. Cuanto mayor es el módulo de  $|T-T_g|$ , más estable será el producto. Por lo tanto, para una adecuada preservación es recomendable que el producto tenga un valor alto de  $T_g$  y un contenido de agua bajo. Para la preservación de bacterias,  $|T-T_g| \sim 40$  °C son usualmente adecuados.

Finalmente, es necesario remarcar que las hipótesis de reemplazo de moléculas de agua y vitrificación no son excluyentes sino complementarias. Al respecto, se ha especulado con que mezclas de fructanos de alto DP y bajo DP podrían otorgar una mayor protección de membranas lipídicas: los fructanos de menor DP interaccionarían con la membrana y los fructanos de mayor DP proveerían una alta  $T_g$  (Crowe *et al.*, 1997). En este sentido, ha sido informado que el uso conjunto de maltodextrina y glucosa permite una mejor protección de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* deshidratado. La glucosa es capaz de interaccionar con membranas lipídicas y la maltodextrina contribuye a aumentar la  $T_g$  (Oldenhof *et al.*, 2005). Esto confirma que la vitrificación es una condición necesaria pero no suficiente para una buena protección, y explica por qué polisacáridos con una alta  $T_g$  (*i.e.*, maltodextrinas, almidón) no son buenos protectores. Por ello, algunos autores enuncian que el uso en conjunto polisacáridos con alta  $T_g$  y azúcares pequeños que no tienen tan alta  $T_g$  pero que interaccionan eficientemente con membranas (*i.e.*, glucosa o

sacarosa) podrían ser una buena estrategia de protección (Crowe *et al.*, 1992, 1998), tal como se indicó en el párrafo anterior en relación al uso conjunto de maltodextrina y glucosa.

### **Métodos de preservación**

El incremento en la demanda de alimentos saludables impulsado por la creciente conciencia pública sobre el efecto de los alimentos y de los hábitos alimentarios sobre la salud llevó a la industria a desarrollar alimentos con propiedades beneficiosas. En este sentido, el consumo de probióticos, o de alimentos que los incorporen, representa una buena estrategia. En la mayoría de los casos los productos disponibles en el mercado son productos lácteos, observándose una demanda creciente de productos no lácteos que incorporen probióticos. El desafío es producir grandes cantidades de probióticos viables y estables en el tiempo para ser empleados como inóculo o directamente incorporados en un alimento. Por lo tanto, el desarrollo de estrategias adecuadas de preservación resulta fundamental para la expansión de la industria de los alimentos funcionales que contengan probióticos (Rezzonico *et al.*, 2015; Bhadekar & Parhi, 2016).

De acuerdo al consenso de especialistas, se recomienda que los alimentos con probióticos contengan al menos  $10^7$ - $10^9$  UFC de microorganismos viables por gramo al momento de ser ingeridos (Hill *et al.*, 2014). Sin embargo, mantener la viabilidad de las bacterias durante la preparación, procesamiento y almacenamiento del producto requiere del desarrollo metodologías adecuadas.

La deshidratación de microorganismos es ampliamente usada como medio para la estabilización de probióticos para facilitar su almacenamiento, manejo, transporte y subsecuente uso en un alimento funcional (Santivarangka *et al.*, 2008). Dependiendo del método de deshidratación, las bacterias se ven sometidas a diferentes tipos de estrés (hídrico, osmótico, térmico, oxidativo, etc.), los cuales representan la mayor causa de pérdida de la viabilidad de un probiótico (Fu & Chen, 2011). Como se mencionó anteriormente, la membrana citoplasmática es el principal sitio de daño, y la oxidación de lípidos, la alteración de la permeabilidad o la desnaturalización de macromoléculas de membrana son algunos de los marcadores que indican la severidad de la deshidratación.

La liofilización y el secado por *spray* son las técnicas más usadas para la deshidratación de cultivos probióticos y bacterias ácido lácticas (Betoret *et al.*, 2003), aunque otros métodos tales como el secado por vacío y el secado por lecho fluidizado también son empleados. Asimismo, se desarrollaron técnicas innovadoras como el secado por vacío asistido por microondas (Ambros *et al.*, 2016) (ver capítulo III), o la liofilización asistida por *spray* (*spray-freeze drying*) (Leuenberger *et al.*, 2002).

En el caso de la liofilización, aunque requiere tiempos de proceso largos, sigue siendo el método de preferencia debido a su reducido impacto en las características funcionales del producto, y al bajo costo de almacenamiento y transporte del producto deshidratado (Peiren *et al.*, 2016). Durante el proceso se distinguen tres etapas principales: la fase de congelación, la primera fase de deshidratación (sublimación) y la segunda fase de deshidratación (desorción). En este sentido, la congelación necesaria para la sublimación del agua es una causa adicional de estrés para las células, lo cual genera una mayor susceptibilidad en los lípidos de membrana.

El secado por *spray* es una técnica adecuada para la obtención de productos en polvo, y se basa en la evaporación rápida del agua de un líquido atomizado (*spray*) en la cámara de atomización. El aire caliente fluye a favor o a contra corriente evaporando el agua de las partículas atomizadas, transformando una suspensión de probiótico en un polvo. Esta tecnología permite trabajar a gran escala con tiempos cortos de procesamiento, lo cual representa una ventaja desde el punto de vista económico (Ishwarya *et al.*, 2015). Sin embargo, el estrés térmico asociado al proceso de secado (temperaturas entre 150 y 200°C) puede generar pérdidas de viabilidad.

Además de la pérdida de viabilidad durante la deshidratación asociada a los procesos de preservación, el almacenamiento representa otro desafío para el desarrollo de alimentos funcionales que contengan probióticos. El mecanismo detrás de la pérdida de viabilidad depende de una serie de factores, que incluyen la temperatura, el contenido de humedad, el empleo de protectores, el estrés oxidativo y fundamentalmente el daño de estructuras sensibles (Fu & Chen, 2011).

Como se mencionó, la supervivencia de los microorganismos durante la deshidratación y el subsecuente almacenamiento depende de varios factores, tales como la especie o cepa empleada, las condiciones de secado, el inóculo y el medio de cultivo (Panoff *et al.*, 2000), la pre-adaptación al estrés (Tymczynsyn *et al.* 2007), o el uso de agentes protectores (Champagne *et al.*, 2005). Los compuestos polihidroxiados, tales como la sacarosa, la trehalosa, el glicerol, así como compuestos que contienen azúcares y proteínas, como el suero lácteo o la leche descremada e inclusive algunos polisacáridos como la maltodextrina, la goma arábiga o exopolisacáridos producidos por las mismas células, son empleados actualmente como agentes protectores en la deshidratación de probióticos. En este sentido, el uso de carbohidratos prebióticos como agentes protectores representa una alternativa atractiva, ya que permite incorporar prebióticos y probióticos simultáneamente en el alimento, es decir dos ingredientes que aportan beneficios a la salud (Romano *et al.*, 2014; Tavera-Quiroz *et al.*, 2015).

## Uso de prebióticos como protectores de probióticos y bacterias ácido lácticas *starters*

El uso de agentes protectores es necesario para evitar la inactivación bacteriana durante procesos que conllevan deshidratación, garantizando así la estabilización durante el almacenamiento. El rol de los prebióticos como compuestos protectores ha sido menos explorado que el de otros compuestos.

El efecto protector de prebióticos ha sido sistemáticamente más estudiado en la liofilización que en otros métodos de preservación. En los últimos años, los oligo- y polisacáridos incluyendo inulina, FOS y GOS demostraron una alta eficiencia como protectores de bacterias lácticas (Schwab *et al.*, 2007; Tymczyszyn *et al.*, 2011, 2012; Golowczyc *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2014a,b).

Las propiedades protectoras de los GOS fueron investigadas por primera vez en 2011 (Tymczyszyn *et al.*, 2011). Preparaciones comerciales con alto contenido de GOS son muy eficientes en la protección de bacterias lácticas durante la deshidratación, siendo aquellos con DP3 y DP4 los componentes con mayor capacidad protectora (Tymczyszyn *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2014b). Diferentes estudios termofísicos informaron sobre la capacidad de los GOS para formar estructuras vítreas, respaldando así su capacidad protectora (Torres *et al.*, 2011; Tymczyszyn *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014b,c). Tymczyszyn *et al.* (2012) investigaron la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in matrices amorfas de GOS equilibradas a diferentes humedades relativas luego de un proceso de preservación que involucró congelación, liofilización y almacenamiento. Los autores concluyeron que la preservación de los microorganismos mejoró a baja movilidad molecular y esta condición se obtuvo a bajos contenidos de agua y temperaturas de almacenamiento bajas.

La adición de inulina a cultivos de probióticos mejora la viabilidad de éstos durante la liofilización (Carvalho *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 2005). Shu *et al.* (2012) informaron el efecto protector de los FOS, isomalto-oligosacáridos, inulina y xilo-oligosacáridos en la liofilización de *Bifidobacterium bifidum*. Los FOS demostraron ser también eficaces protectores durante la liofilización, secado por *spray* y almacenamiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus cremoris* (Dianawati *et al.*, 2013). Schwab *et al.* (2007) estudiaron el efecto protector de FOS sobre la viabilidad y la integridad de la membrana de *Lactobacillus reuteri* liofilizado. En dicho estudio la inulina mostró un efecto protector sobre la viabilidad bacteriana, pero no sobre la integridad de la membrana. El mantenimiento de la integridad de la membrana de *Lactobacillus reuteri* liofilizado en presencia de FOS fue atribuido a la interacción directa FOS-lípidos, lo cual llevó a un aumento de la fluidez y, consecuentemente, estabilización de la membrana.

## Simbióticos

El término “simbiótico” se refiere a un producto alimenticio que contiene, en forma combinada, probióticos y prebióticos, los cuales actúan en forma sinérgica para modular la microbiota intestinal del consumidor e impactar positivamente sobre su salud (Bhupinder & Saloni, 2010).

Existen evidencias de que los prebióticos podrían actuar como sustratos específicos de los microorganismos probióticos, mejorando la supervivencia y actividad de los mismos (Gibson *et al.*, 1995; Nagpal *et al.*, 2007). Por lo tanto, esta combinación hace que el prebiótico se encuentre fácilmente disponible para su fermentación.

Para el ser humano, el paradigma del alimento simbiótico es la leche materna, la cual contiene tanto lactobacilos y bifidobacterias como oligosacáridos y nucleótidos (probióticos y prebióticos). Con el objetivo de acercarse más a la composición de la leche materna, las fórmulas infantiles han ido incorporando probióticos, prebióticos y a veces mezclas de ambos (simbióticos) en su formulación (Brunser *et al.*, 2006; Mugambi *et al.*, 2012).

Un factor importante en el momento de desarrollar un simbiótico es determinar la compatibilidad entre la cepa probiótica y el tipo de prebiótico utilizado. También es importante tener en cuenta que el componente prebiótico puede ser incorporado con más facilidad a un gran número de matrices alimenticias mientras que el componente probiótico, por ser un microorganismo vivo, es un factor limitante al uso de simbiótico en dichas matrices. Los principales alimentos con simbióticos son productos lácteos, ya que la leche es la matriz más adecuada y fácil de usar para los probióticos que, en su mayoría, son bacterias lácticas (Puccio *et al.*, 2007; Bhupinder and Saloni, 2010; Mugambi *et al.*, 2012).



# OBJETIVOS

Dentro del contexto teórico anteriormente presentado se definieron los siguientes objetivos para este trabajo de Tesis Doctoral.

## **OBJETIVO GENERAL:**

- Determinar el efecto protector de fructo-oligosacáridos (FOS) de cadena corta sobre bacterias lácticas expuestas a procesos de deshidratación.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Optimizar la síntesis de FOS de diferente composición a partir de sacarosa.
- Implementar métodos basados en la espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR) asociada a análisis multivariante para determinar la composición de FOS y monosacáridos presentes en las mezclas de síntesis.
- Investigar el efecto protector de los FOS sintetizados durante la liofilización y la deshidratación por vacío y microondas (*microwave vacuum drying*) de bacterias lácticas.
- Utilizar los FOS obtenidos en el diseño de alimentos deshidratados.



# CAPÍTULO I

Síntesis enzimática de Fructo-  
oligosacáridos monitoreada mediante  
espectroscopía FTIR y análisis  
multivariante. Efecto de la concentración  
de sustrato

# INTRODUCCIÓN

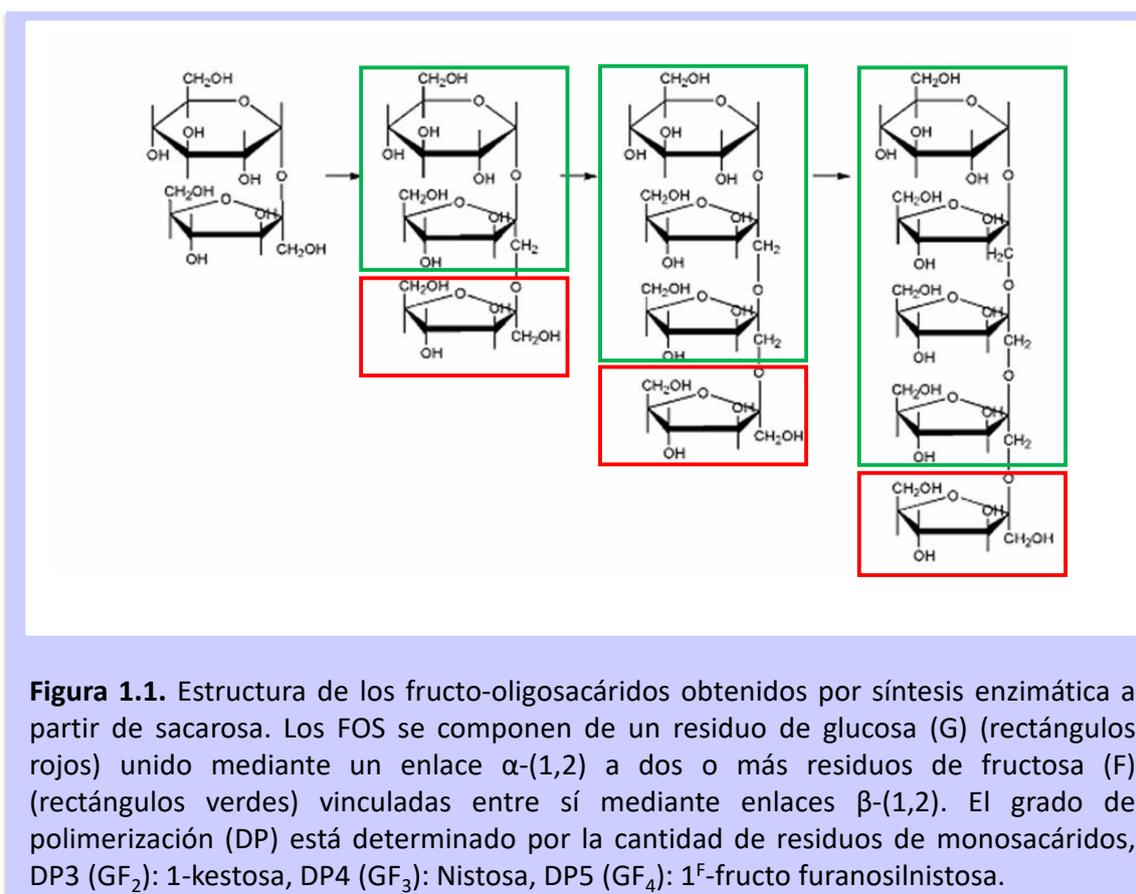
Se estima que el mercado mundial de los FOS fue de 134000 toneladas en 2015 y se espera un crecimiento sostenido para los próximos años. Las industrias con más demanda son las de alimentos y bebidas, suplementos dietarios, alimentación animal y farmacéutica (<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/fructooligosaccharides-market>). En la industria de los alimentos, se destaca el uso de FOS en diferentes productos, tales como panificados, bebidas, cereales de desayuno y barras de cereales, caramelos, productos lácteos tradicionales y alternativos, mermeladas, helados, conservas de frutas, entre otros (Bhadekar & Parhi, 2016).

En nuestro país no se producen FOS u otra clase de prebióticos (Ministerio de Agroindustria de la Nación), siendo el mercado nacional netamente dependiente de la importación de los mismos. Si bien la oferta de alimentos que incorporan prebióticos es limitada, un caso destacable es el del yogurt Sancor Bio (SanCor, Argentina), un simbiótico que combina los probióticos *Lactobacillus casei* Sancor CRL 431 y *Lactobacillus acidophilus* Sancor CRL 730, con una mezcla de inulina y FOS. Se comercializa también un preparado multinutricional (Ensure, Abbott Laboratories; Mexico) que combina carbohidratos simples, proteínas, lípidos y prebióticos (FOS 4.5 % p/p, Beneo Sinergy 1). En marzo de 2016, la ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) autorizó un suplemento dietario (Yacón Andina Real, Argentina), a base de un extracto seco de tubérculos y hojas de Yacón (*Smallanthus sonchifolius*). El principio activo de dicho producto son los FOS, y está indicado como regulador de la flora intestinal (Expediente N°1-0047-0000-003584-15-9).

### 1.1.1 Síntesis de FOS

La estructura química de los fructanos depende de su origen. En el caso de los fructo-oligosacáridos (FOS) obtenidos mediante síntesis enzimática empleando fructosiltransferasas de origen fúngico ( $\beta$ -fructofuranosidasa, EC 3.2.1.26 o  $\beta$ -D-transfructosilasa, EC 2.4.1.9), las unidades de fructosa están unidas por enlaces (2 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -glicosídico y presentan una sola unidad D-glucosilo en el extremo no reductor (Figura 1.1). Estos enlaces son similares a los encontrados en la inulina (Ver Introducción general pag. 8).

Dependiendo de las condiciones de reacción, durante la síntesis de FOS, se obtienen mezclas de oligosacáridos de cadena corta, esto es, 1-kestosa [grado de polimerización (DP) igual a 3], nistosa (DP4), 1F-fructofuranosilnistosa (DP5) (Vega & Zuniga-Hansen, 2011, 2012, 2014; Romano *et al.*, 2016) (Figura 1.1).

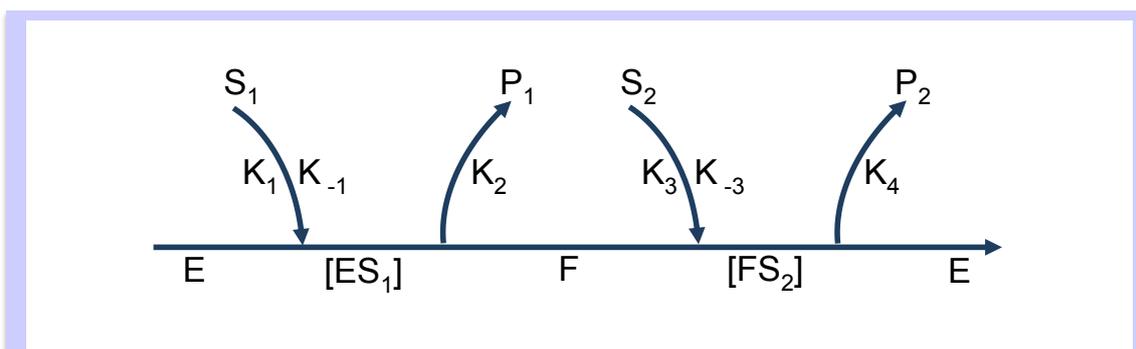


En presencia de sacarosa, en condiciones de reacción y concentración de sustrato adecuadas, las fructosiltransferasas son capaces de llevar a cabo diferentes reacciones. Pueden actuar sintetizando un polímero, transfiriendo unidades de fructosa a la cadena creciente o hidrolizar ésta a sacarosa

(Flores-Maltos *et al.*, 2016). Cuando se agrega una molécula al medio de reacción, ésta se denomina aceptor, la enzima también puede transferirle una fructosa produciendo una molécula fructosilada denominada fructósido.

La síntesis enzimática de FOS de cadena corta es un proceso complejo que involucra diferentes reacciones de síntesis (transfructosilación) e hidrólisis que se producen de forma simultánea (en paralelo y en serie), a través de reacciones consecutivas desproporcionadas (Vega & Zuniga-Hansen, 2014). En la Figura 1.2 se describe el mecanismo de síntesis, el cual se ajusta al mecanismo de doble desplazamiento o *ping-pong*: la enzima y la sacarosa forman un intermediario (*ping*), y la glucosa es liberada (*pong*). Este complejo interactúa, por ejemplo, con una molécula de agua (*ping*), y una molécula de fructosa es entonces transferida a un segundo producto-fructosa (*pong*). Este segundo producto puede adicionar unidades fructosilo (y consecuentemente aumentar su DP), o bien actuar como fructósido (Flores-Maltos *et al.*, 2016).

En estas reacciones, los FOS sintetizados en los primeros pasos actúan como donantes y aceptores de grupos fructosilos que conducen a la producción simultánea de FOS con DP mayor ( $DP_{n+1}$ ) y menor ( $DP_{n-1}$ ) (Jung *et al.*, 1989). Cuando la disponibilidad de sacarosa (DP2) es alta, como ocurre en el inicio de la reacción enzimática, la reacción se desplaza hacia la producción de DP3 ( $DP_{2+1}$ ), con liberación de glucosa ( $DP_{2-1}$ ). Una vez alcanzada la conversión máxima de sacarosa, DP3 actúa como donante y aceptor de un grupo fructosilo para producir DP4. Este último actúa como donante y aceptor de un grupo fructosilo para producir DP5 sólo cuando DP3 comienza a disminuir (Vega, & Zuñiga-Hansen, 2014).



**Figura 1.2.** Mecanismo de reacción tipo *ping-pong*. E representa a la enzima libre;  $S_1$  y  $S_2$  son el primer y el segundo sustrato, respectivamente;  $ES_1$  representa el complejo binario enzima-sustrato;  $FS_2$  representa otro complejo binario;  $P_1$  y  $P_2$  son el primer y el segundo producto de la reacción enzimática, respectivamente;  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$ ,  $K_4$  y  $K_{-1}$ ,  $K_{-3}$  son las constantes de velocidad de reacción de las reacciones directas y reversas, respectivamente.

### 1.1.2 Fructosiltransferasas

Las glicosil hidrolasas (GH) están presentes en varios organismos vivos, desde microorganismos como bacterias, levaduras y hongos, hasta organismos multicelulares complejos tales como plantas y animales. Esta familia de enzimas participa en diferentes procesos en la naturaleza, tales como biosíntesis de glicanos, metabolismo de la pared celular en plantas, señalización, defensa y movilización de reservas de almacenamiento (Lammens *et al.*, 2009). Las fructosiltransferasas [familias GH32 y GH68 (Clasificación CAZy; Cantarel *et al.*, 2009)] se encargan de la síntesis o hidrólisis de fructanos. Las enzimas de ambas familias pueden ser clasificadas de acuerdo a su origen y de acuerdo a su actividad enzimática (Tabla 1.1).

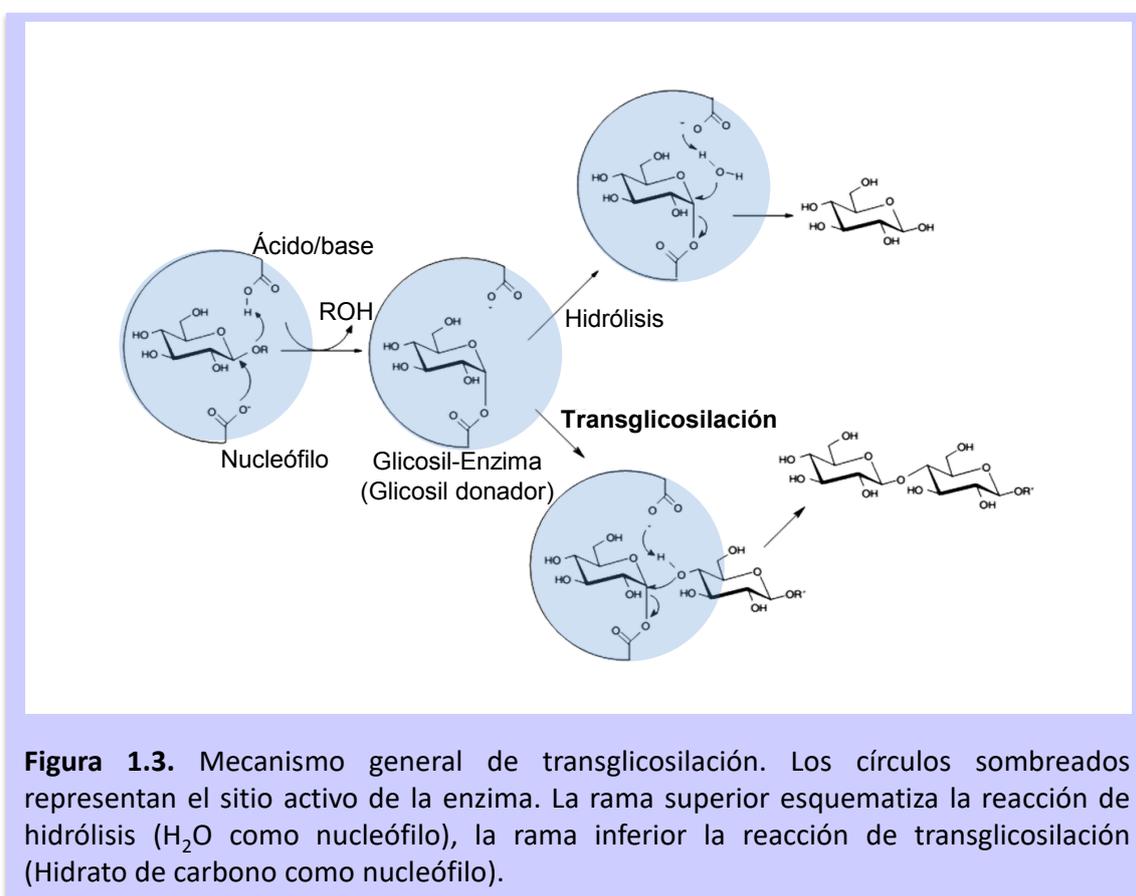
Las fructanhidrolasas microbianas agrupadas en la familia GH32 incluyen exo-fructanhidrolasas (exo-inulinasas y exo-levanasas, E.C. 3.2.1.80 y E.C. 3.2.1.64) y endo-fructanhidrolasas (endo-inulinasas o endo-levanasas, E.C. 3.2.1.7 y E.C. 3.2.1.65). Un solo tipo de enzima excretada es suficiente para la síntesis de FOS o fructanos de diferente DP y con diferentes tipos de enlaces fructosilo. Algunas de estas enzimas son fructosilhidrolasas con actividad fructosiltransferasa (Arrizón *et al.*, 2014). La familia GH68 contiene principalmente enzimas con actividad fructosiltransferasa (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Enzimas de las familias GH32 y GH68 - Origen y tipo de actividad enzimática. Adaptado de Arrizón *et al.* (2014).

<i>Familia</i>	<i>Origen</i>	<i>Tipo de actividad enzimática</i>
GH32	Plantas	Invertasa
		Exo-fructanhidrolasa
		Fructosiltransferasa
	Hongos y levaduras	Invertasa
		Exo-fructanhidrolasa
		Endo-fructanhidrolasa
GH68	Bacteria	Fructosiltransferasa:
	Bacteria	Inulosucrasas
		Levansucrasas
		Otras fructosiltransferasas
		$\beta$ -Fructosidasa

La síntesis de FOS catalizada por fructosiltransferasas se ajusta al mecanismo general de las reacciones de transglicosilación. La misma procede por un mecanismo de doble desplazamiento en el cual se forma un enlace covalente glicosil-enzima intermediario (glicosil donador) producto del

ataque de un grupo carboxilo desprotonado de la enzima al centro anomérico del carbohidrato donador con la concomitante ruptura del enlace glicosídico C-O y la liberación de un residuo de azúcar (glucosa en el caso de la síntesis de FOS). El segundo paso es el ataque de un nucleófilo al intermediario glicosil-enzima, que está asistido por la base conjugada de un segundo residuo carboxilo de la enzima. Los nucleófilos H<sub>2</sub>O o hidratos de carbono (glicosil-aceptor) compiten por el intermediario glicosil-enzima (Figura 1.3). Cuando el nucleófilo es H<sub>2</sub>O, la enzima actúa como una hidrolasa; cuando el nucleófilo es un hidrato de carbono, la enzima actúa como una transferasa. La relación hidrolasa/transferasa depende de dos factores principales: (1) la concentración de aceptor (altas concentraciones favorecen la transferencia del residuo glicosilo); y (2) las propiedades intrínsecas de la enzima. Una transglicosidasa se considerará eficaz si posee capacidad significativa para unir al aceptor y para excluir H<sub>2</sub>O.



Existen en el mercado preparaciones enzimáticas de uso industrial, con ventajas económicas y técnicas tales como bajo costo, versatilidad de sustrato y estabilidad en condiciones de procesos industriales, entre otras. La mayoría de estas preparaciones tienen tanto actividad transfructosilasa como hidrolasa, por lo cual para la síntesis de FOS se deben seleccionar aquellas con alta actividad

transfructosilasa. *Viscozyme L* es un preparado enzimático obtenido a partir de la fermentación de *Aspergillus aculeatus* (Novozyme, Dinamarca) con comprobada capacidad para la síntesis de FOS, ya que tiene una alta actividad transfructosilasa y una alta relación transfructosilasa/hidrolasa (Vega & Zuñiga-Hansen, 2012; Lorenzoni *et al*, 2014, 2015).

### 1.1.3 Espectroscopía de Infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR)

Las técnicas de espectroscopía vibracional, que incluyen tanto la espectroscopía Raman como la de infrarrojo, son herramientas muy eficaces para el estudio de la estructura y la reactividad molecular, tanto en moléculas de pequeña dimensión como en biomoléculas más complejas. Un espectro de infrarrojo o de Raman contiene información detallada sobre la naturaleza del sistema en estudio, su composición, las interacciones intra e intermoleculares más importantes que en él operan, la estereoquímica, etc. Asimismo, su evolución con el tiempo permite, en muchos casos, monitorear procesos y reacciones químicas en tiempo real y extraer información útil para establecer los mecanismos involucrados (Naumann *et al.*, 1991; Schultz & Naumann, 1991; Cervera *et al.*, 2009; Cámara-Martos *et al.*, 2011).

#### 1.1.3.1 Absorción en el Infrarrojo

El espectro es un gráfico que muestra la cantidad de radiación transmitida, reflejada o difundida por una muestra, en función de la energía (E) o de una magnitud proporcional a ésta. En espectroscopia vibracional es usual expresar la energía de la radiación en números de onda ( $\tilde{\nu}$ ), definido como la inversa de la longitud de onda ( $\lambda$ ). Como la E está definida como:  $E = h\nu$  y  $\nu = \frac{c}{\lambda}$

siendo  $\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$  entonces

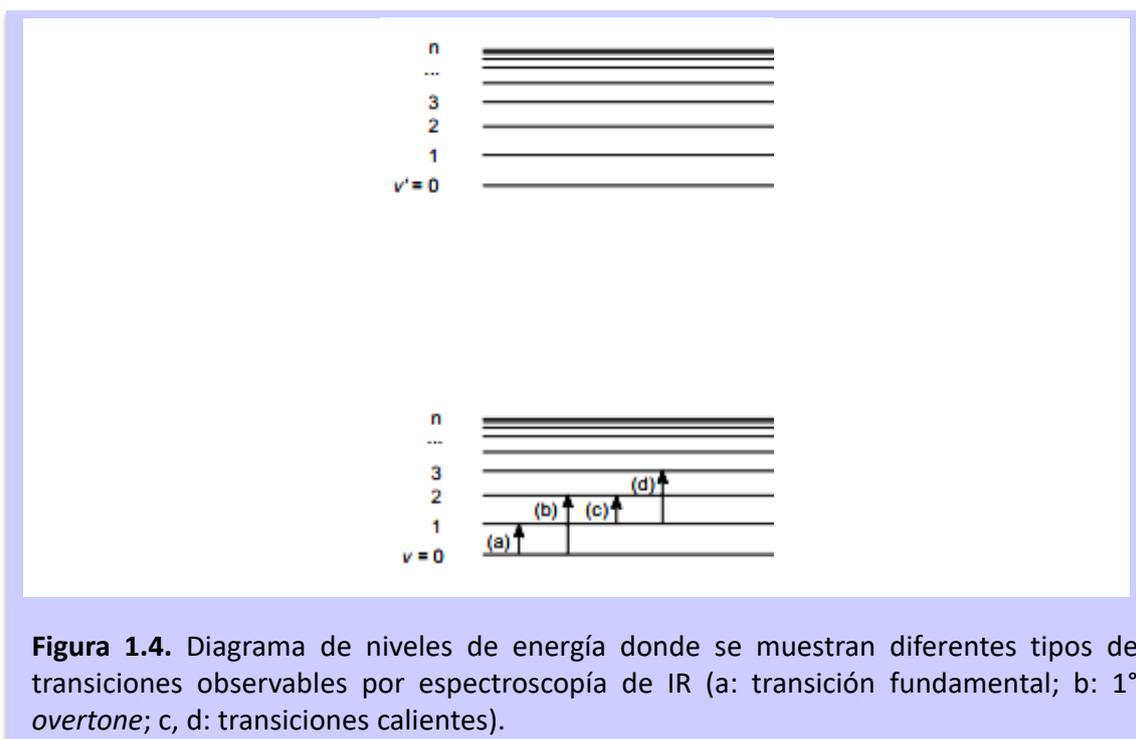
$$E = \frac{hc}{\lambda} = hc\tilde{\nu} \quad (\text{Ec. 1.1})$$

Donde E es la energía,  $\lambda$  es la longitud de onda,  $\nu$  es la frecuencia,  $\tilde{\nu}$  el número de onda,  $h$  es la constante de Planck y  $c$ , la velocidad de la luz.

En la Figura 1.4 se muestran dos conjuntos de líneas que representan los niveles vibracionales del estado electrónico fundamental y del primer estado electrónico excitado, siendo  $\nu$  y  $\nu'$  los respectivos números cuánticos vibracionales.

En espectroscopía de IR las transiciones involucran sólo un fotón, que se obtiene del haz de radiación IR policromática que incide en la molécula. La absorción infrarroja está asociada a

excitaciones vibracionales y rotacionales, sin que se produzcan transiciones electrónicas (Figura 1.4). Así, los espectros IR se originan a partir de transiciones entre niveles vibracionales de la molécula en el estado electrónico fundamental ( $v_{0 \rightarrow 1}$ , Figura 1.4) y son, por lo general, observados como espectros de absorción en la región del infrarrojo. Desde un punto de vista cuántico, una vibración es activa en el IR cuando existe una variación del momento dipolar de la molécula respecto de la coordenada del modo de vibración.



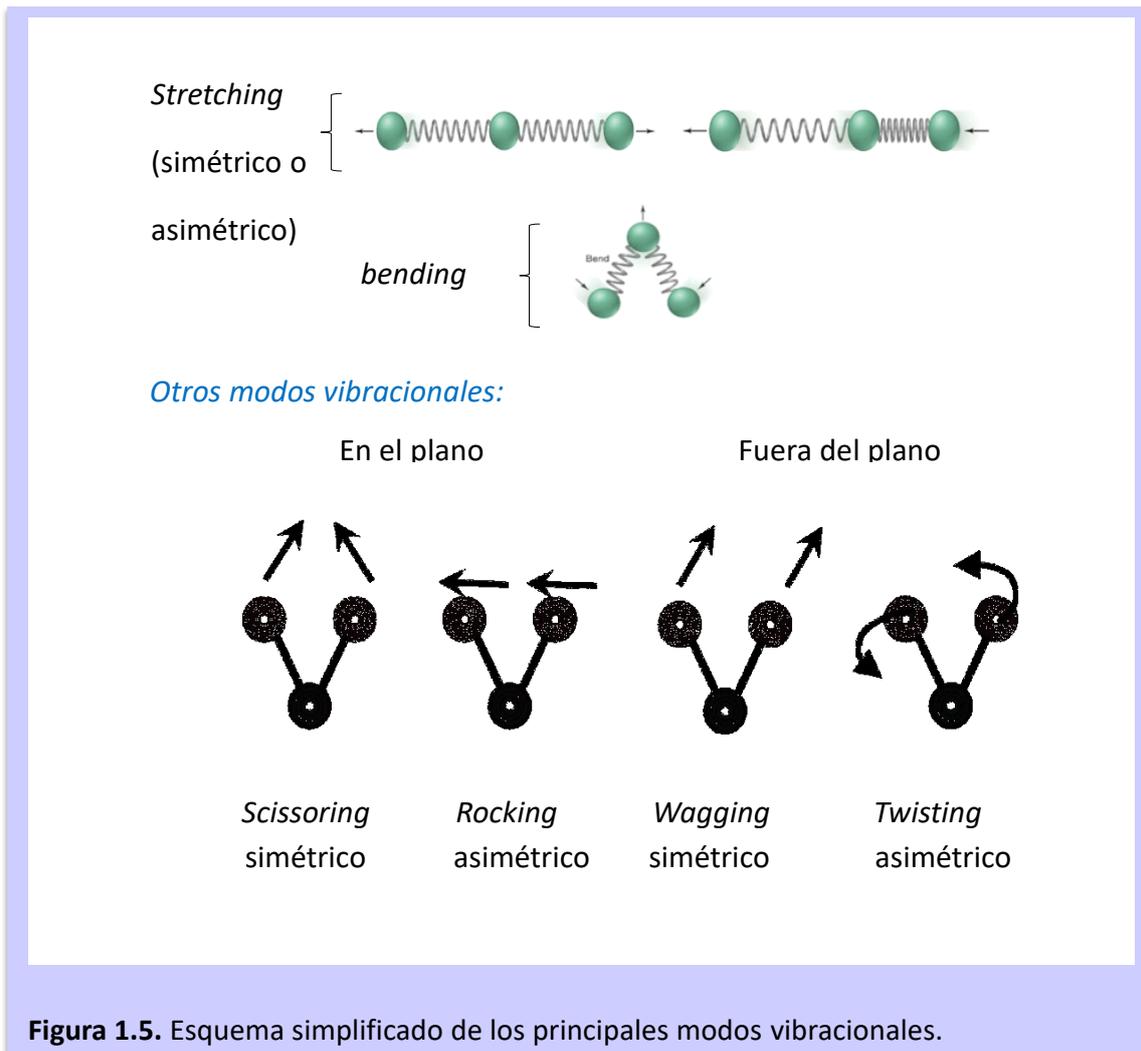
**Figura 1.4.** Diagrama de niveles de energía donde se muestran diferentes tipos de transiciones observables por espectroscopía de IR (a: transición fundamental; b: 1° overtone; c, d: transiciones calientes).

### 1.1.3.2 Modos Vibracionales

Una molécula aislada tiene  $3N-6$  modos vibracionales (o  $3N-5$ , si es lineal), asociados a las transiciones  $v_{0 \rightarrow 1}$  ( $v =$  número cuántico vibracional; Figura 1.4), donde  $N$  representa el número de átomos de la molécula. Estos modos normales son por tanto movimientos particulares del conjunto de átomos que conforman la molécula, los cuales son independientes unos de otros y tienen una frecuencia de vibración característica. Aunque estos movimientos sean colectivos, en muchos casos es posible identificar la vibración como principalmente de tipo *stretching* o de tipo *bending* (Figura 1.5).

El número máximo de modos vibracionales *stretching* para un enlace en particular está dado por el número total de enlaces en la molécula. Así, en el caso del  $H_2O$ , existen dos enlaces O-H que dan

lugar a dos modos *stretching*  $\nu(\text{O-H})$ . Sin embargo, los dos enlaces no vibran de forma independiente, sino que sus movimientos se acoplan y vibran en fase o en oposición de fase, dando lugar a un modo simétrico y otro asimétrico de las vibraciones ( $\nu_1 = 3652 \text{ cm}^{-1}$  y  $\nu_3 = 3756 \text{ cm}^{-1}$ ) con números de onda similares porque ambos modos suponen el estiramiento de los enlaces O-H. De forma análoga, sólo un ángulo define esta molécula y genera un único modo vibracional *bending* para el  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\nu_2 = 1595 \text{ cm}^{-1}$ ).



En espectroscopía infrarroja pueden ocurrir transiciones de orden superior (*overtones* y modos de combinación) y vibraciones correspondientes a transiciones cuyo estado inicial es un estado vibracional excitado (transiciones calientes, Figura 1.4), las cuales originan señales espectroscópicas, en general de baja intensidad, aumentando así el número de bandas observadas en los espectros.

Todas estas características convierten a los espectros IR de biomoléculas y de sistemas biológicos en conjuntos de bandas complejas y solapadas que constituyen verdaderas huellas

digitales y que contienen una gran cantidad de información, pero que requieren un análisis adecuado para la obtención de resultados confiables.

### 1.1.3.3 Aspecto de las Bandas

El aspecto de las bandas observadas en los espectros es variable y depende de diferentes factores. Sus intensidades dependen del número de moléculas que interacciona con la radiación usada para obtener el espectro y de la probabilidad intrínseca de las transiciones correspondientes. En espectroscopia IR, eso está relacionado con la magnitud de la variación del momento dipolar de la molécula ( $\mu$ ).

$$I_k(IR) = \frac{\pi N_A g_k}{3000c^2 \times 2.302581} |\partial\mu/\partial Q_k|^2 \quad (\text{Ec. 1.2})$$

En la ecuación 1.2  $I_k(IR)$  es la intensidad de la señal asociada a la coordenada vibracional  $Q_k$  en el espectro IR,  $N_A$  es el número de Avogadro ( $\text{mol}^{-1}$ ),  $c$  la velocidad de la luz ( $\text{cm s}^{-1}$ ),  $g_k$ , el grado de degeneración del nivel vibracional inicial y  $\partial\mu/\partial Q_k$ , la derivada del momento dipolar en relación a la coordenada vibracional  $Q_k$  ( $\text{cm}^{3/2} \text{s}^{-1}$ ). En el sistema de unidades internacional,  $I_k(IR)$  se expresa en  $\text{cm}^{-2} \text{L mol}^{-1} = 10 \text{ m mol}^{-1}$ , a pesar de que es más común usar la unidad  $\text{km mol}^{-1}$ . Experimentalmente  $I_k(IR)$  se puede obtener de forma aproximada a través de la ley de Lambert-Beer:

$$I_k(IR) = \frac{1}{CL} \int \log(I_0/I) dv \quad (\text{Ec.1.3})$$

Donde  $C$  y  $L$  representan la concentración de la muestra ( $\text{mol L}^{-1}$ ) y el camino óptico (cm), respectivamente, e  $I_0/I$ , la razón de las intensidades de la radiación incidente y transmitida. La integral se extiende a todo el dominio de número de onda ( $\nu$ ) en el cual la absorción es significativa.

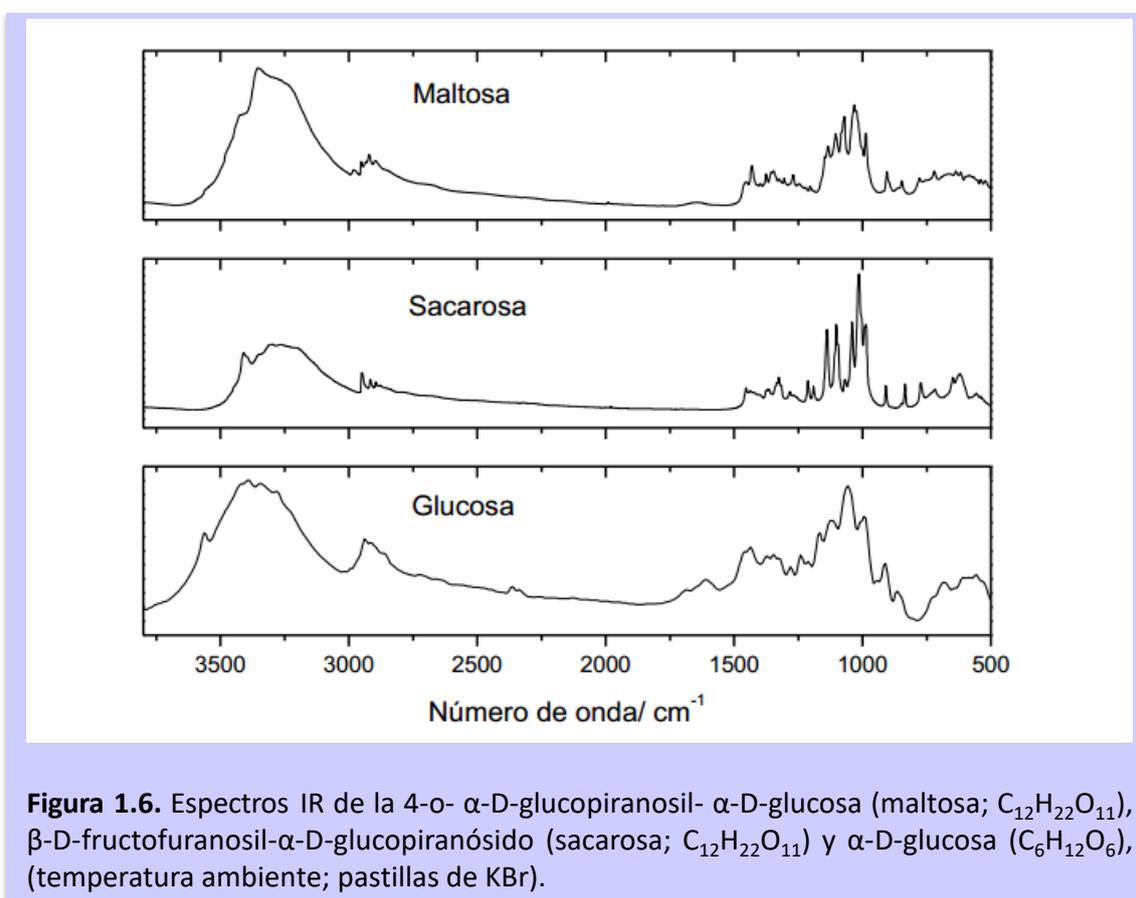
El hecho de que la intensidad de las bandas de un espectro IR dependa de la variación del momento dipolar explica la usual mayor intensidad de las bandas asociadas a vibraciones de grupos más polares (por ejemplo el grupo carbonilo, C=O).

El valor de energía correspondiente al máximo de una banda se relaciona directamente con la energía de transición vibracional. Para la mayoría de las transiciones fundamentales, ese valor es del orden de magnitud de la energía de la radiación IR, es decir, entre  $4000$  y  $400 \text{ cm}^{-1}$  (infrarrojo medio). Por debajo de  $400 \text{ cm}^{-1}$  (IR lejano;  $400\text{-}10 \text{ cm}^{-1}$ ) se observan vibraciones fundamentales de más baja energía. Por encima de los  $4000 \text{ cm}^{-1}$ , en la región normalmente designada por infrarrojo

cercano (NIR: near infrared; 12800-4000  $\text{cm}^{-1}$ ), se pueden observar *overtones* y modos de combinación que involucran por lo menos una coordenada vibracional cuya transición fundamental ocurre por arriba de 2000  $\text{cm}^{-1}$  (Workman, 1999; Skoog *et al.*, 2001).

#### 1.1.3.4 Estudio de carbohidratos mediante FTIR

Los hidratos de carbono presentan en su estructura un gran número de grupos OH. Estos grupos son muy flexibles conformacionalmente y pueden participar en enlaces de hidrógeno como aceptores o dadores de electrones. La similitud de los grupos sustituyentes y su naturaleza hacen que los espectros vibracionales de las diferentes formas de una molécula de hidrato de carbono sean similares entre sí (Figura 1.6) (Huang *et al.*, 2008).



**Figura 1.6.** Espectros IR de la 4-o-  $\alpha$ -D-glucopiranosil-  $\alpha$ -D-glucosa (maltosa;  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ),  $\beta$ -D-fructofuranosil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (sacarosa;  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ) y  $\alpha$ -D-glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), (temperatura ambiente; pastillas de KBr).

Una de las regiones espectrales que mayor información estructural proporciona es la región 1200-800  $\text{cm}^{-1}$ , considerada como *fingerprint* porque permite diferenciar los azúcares entre sí. En esta región, las bandas características de un anillo del tipo furanosa o piranosa (principalmente debido a vibraciones  $\nu\text{C-C}$ ) pueden ser diferenciadas ya que son observadas a 875 y 825  $\text{cm}^{-1}$ ,

respectivamente (Mathlouthi *et al.*, 1986). Asimismo, el *stretching* simétrico  $\nu$ COC, asociado al enlace glicosídico ( $1150\text{-}820\text{ cm}^{-1}$ ), se ha usado, por ejemplo, en la caracterización de diferentes tipos de celulosa (Oldenhof *et al.*, 2005; Kataoka *et al.*, 1999).

#### 1.1.4 Métodos de análisis multivariante

Las espectroscopías vibracionales generan una gran cantidad de datos, los cuales requieren métodos apropiados de análisis para aprovechar al máximo la información contenida en ellos. En este sentido la quimiometría permite extraer la información presente en los espectros (conjuntos multivariantes de datos) de un conjunto de muestras, ya sea de forma cualitativa como cuantitativa.

La quimiometría es la parte de la química que utiliza métodos matemáticos, estadísticos y de lógica formal para diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, proporcionar información química relevante a partir del análisis de señales analíticas y, finalmente, adquirir conocimiento de los sistemas químicos (Massart *et al.*, 1997).

La quimiometría comprende desde el pretratamiento de los espectros (para mejorar la relación señal/ruido) hasta la utilización de los métodos multivariante. El análisis multivariante busca encontrar una relación entre la señal analítica y alguna propiedad de la muestra. Su utilización permite establecer agrupaciones de muestras en función de su similitud y clasificar nuevas muestras, entre otras aplicaciones (Kramer, 1998; Martens & Naes, 2000).

En líneas generales, los métodos multivariante pueden clasificarse como **no supervisados**, cuando no requieren información adicional para el análisis de los datos, y **supervisados**, cuando sí requieren de esta información.

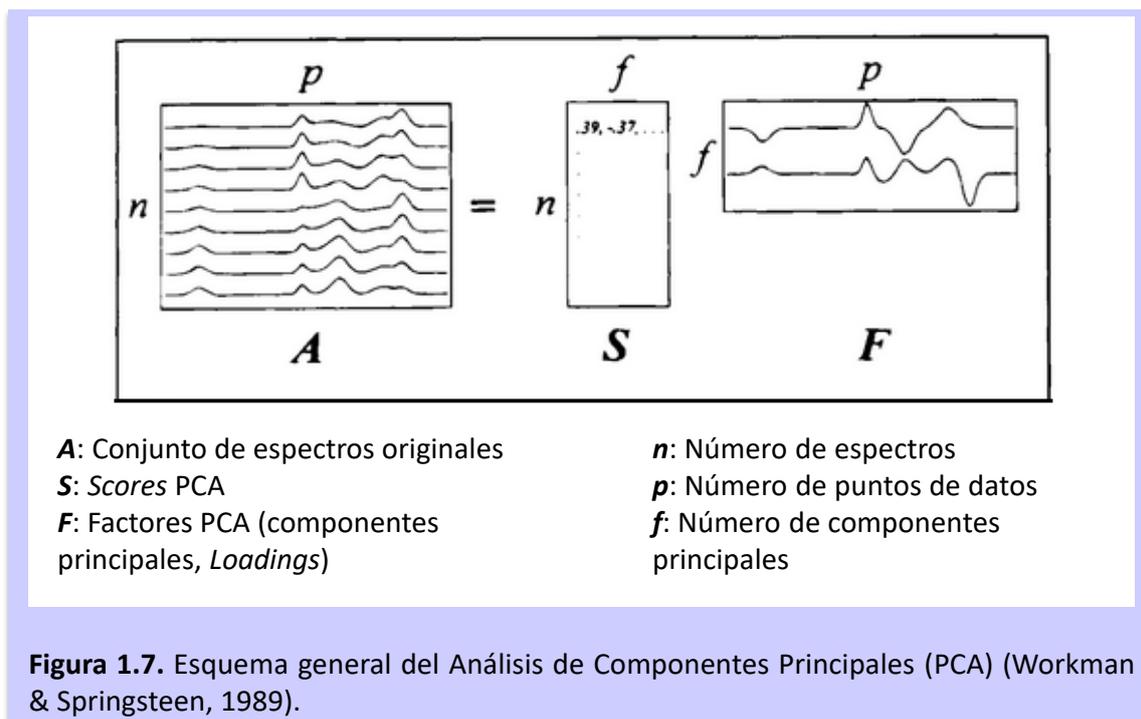
Diversos autores han utilizado métodos multivariante para el análisis de datos espectrales, con fines de discriminación, identificación y/o clasificación de microorganismos y otras muestras biológicas (Mobili *et al.*, 2009). Algunos de los métodos más utilizados para este propósito son: análisis de componentes principales (PCA), análisis por factores (FA), análisis de discriminación lineal (LDA), análisis de *clusters* (HCA), mínimos cuadrados parciales (PLS), redes neuronales (ANNs), entre otros (Ghiamati *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 2004).

A continuación, se describen los métodos multivariante utilizados en este trabajo de tesis, agrupados de acuerdo a la naturaleza cualitativa o cuantitativa de la información que proveen.

### 1.1.4.1 Información Cualitativa

#### Análisis de Componentes Principales (PCA)

El PCA es un método de reducción dimensional que opera de forma no supervisada. Permite reducir la correlación espectral (*i.e.*, los datos que son comunes a todos los espectros), y agrupar las muestras analizadas en función de la variabilidad que contienen (Massart *et al.*, 1997). Este método reduce la dimensionalidad de un conjunto de datos originales (matriz  $A = n \times p$ , Figura 1.7), encontrando un grupo de ejes coordenadas alternativas, matriz de *scores* PCA ( $S = n \times f$ , Figura 1.7) llamadas componentes principales (PCs) (Martens & Nielsen, 2003; Esbensen, 2005). Estos ejes de coordenadas alternativas tienen la propiedad de que la mayor parte de la información está contenida en unas pocas primeras dimensiones, pudiéndose descartar el resto con muy poca pérdida de información.



Si se considera la matriz de datos  $A$ , constituida por  $n$  espectros (Figura 1.7), el objetivo del PCA es explicar la misma información contenida en la matriz  $A$  en un número inferior de datos, que corresponden a las variables de la matriz de datos  $S$ . Estos nuevos datos se conforman de  $f$  componentes principales y constituyen los *scores* PCA ( $S$ ). Su característica principal es que el primero recoge la máxima variabilidad espectral del conjunto de muestras, el segundo recoge una

variabilidad inferior al primero y es ortogonal a él, y así sucesivamente. Los últimos PCs describen esencialmente el ruido en los datos. Por lo tanto, el número de componentes principales se ha de seleccionar de forma tal que contengan información relativa a las muestras y no contengan información relativa al ruido.

La matriz  $A$  se descompone en el producto de dos matrices, una de *scores*  $S$  (relacionada con los objetos) y otra de *loadings*  $F$  (relacionada con las variables), quedando una matriz de residuales  $E$ , con la información no recogida por  $S$  y  $F$ :

$$A = S F + E \quad (\text{Ec. 1.4})$$

Donde  $S$  son las coordenadas de cada punto respecto a los nuevos ejes (componentes principales) y  $F$  son los cosenos de los ángulos entre los nuevos ejes y los ejes originales. El conjunto de datos  $A$ , descrito inicialmente por variables correlacionadas, queda ahora definido por un nuevo conjunto de variables no correlacionadas entre sí en un sistema de ejes ortogonales (Martens & Martens, 2000a y b; Wold, 2001).

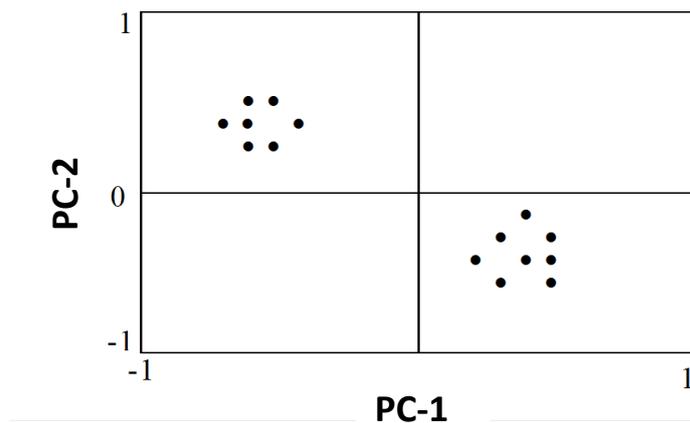
La interpretación de los resultados obtenidos con el PCA se lleva a cabo a partir de una representación de los scores de las muestras en diferentes PCs. Si existe una relación entre las muestras los puntos aparecerán agrupados, mientras que si las muestras no se asemejan entre sí, los puntos aparecerán dispersos entre sí (Figura 1.8). Este análisis permite realizar una selección de muestras que sea representativa del conjunto global de muestras, y usarla *a posteriori* en la calibración de modelos multivariante.

Es importante recordar que PCA actúa de una forma no supervisada, lo que significa que para el análisis de los datos no es necesario ningún tipo de información adicional al conjunto de espectros o datos colectados experimentalmente (Geladi, 2003).

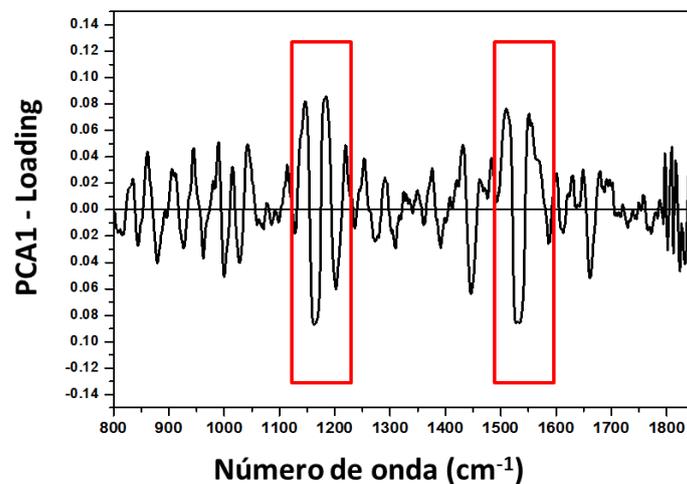
El PCA provee el porcentaje de la varianza explicada por cada PC. Además indica el número de componentes principales (PCs) que retienen la mayor cantidad de información presente en el conjunto de datos, relacionada con su estructura intrínseca (Martens & Nielsen, 2003; Esbensen, 2005).

Los *loadings* muestran el peso (o relevancia) de una determinada variable en el modelo de componentes principales. Son utilizados para entender cuánto contribuye cada variable al significado de la variación de los datos, y de esta manera, interpretar la relación entre variables. También pueden ser utilizados para interpretar el significado de cada componente del modelo.

Teniendo en cuenta que existen menos componentes principales que variables y debido al error de ajuste del modelo con los datos, se produce un error  $E$  que se acumula en la matriz.



**Figura 1.8.** Gráfico de PCA-scores (PC2 vs PC1) obtenidos del análisis de componentes principales de espectros vibracionales de dos especies bacterianas filogenéticamente relacionadas. Las agrupaciones observadas a lo largo del eje de la componente principal 1 (PC-1), corresponden a los dos grupos de bacterias analizadas, al igual que las dos agrupaciones observadas a lo largo del PC-2.



**Figura 1.9.** Gráfico de *loadings* del análisis de PCA realizado en todo el rango del espectro (1800-800  $\text{cm}^{-1}$ ) de dos especies bacterianas relacionadas filogenéticamente. Los recuadros en rojo indican las variables más influyentes.

Adicionalmente, los *loadings* proporcionan información referente a las variables de diagnóstico estadísticamente más importantes o influyentes, relacionadas con las principales diferencias encontradas en el conjunto de datos (Figura 1.9). Así, en la Figura 1.9, las regiones 1100-1200 y 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$  serán aquellas donde se encuentren las variables más influyentes en ese caso.

### 1.1.4.2 Información Cuantitativa

La información contenida en los espectros IR puede correlacionarse con magnitudes físicas o químicas, obteniéndose ecuaciones o modelos de calibración. El fundamento de cualquier calibración es establecer una relación entre la señal instrumental y la propia a determinar, y posteriormente predecir esta propiedad a partir de la señal de medida en una muestra desconocida. Es posible utilizar calibraciones univariantes cuando la señal es selectiva a la propiedad estudiada. Sin embargo, la espectroscopía FTIR proporciona un gran número de variables-respuesta para cada muestra, variables que en general no pueden ser asignadas a un solo analito. Esto ha propiciado el desarrollo de métodos de calibración capaces de relacionar múltiples variables con la propiedad o concentración de analito a determinar. Estos métodos son conocidos como Métodos de Calibración Multivariante. Las características principales de estos métodos son:

- Trabajan con un gran número de medidas de cada muestra, normalmente con el espectro completo.
- Son necesarios los valores de la propiedad a determinar para cada muestra.
- Es posible determinar de forma independiente cada una de las propiedades que se desea cuantificar.

### Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS)

El modelo PLS es un método para la construcción de modelos de predicción cuando las variables son muchas y altamente colineales (no son significativamente redundantes).

Se dispone de una matriz de datos espectrales  $X$  y una matriz  $Y$  que contiene los datos de la propiedad a determinar. La regresión PLS se basa en un cálculo de reducción de variables, donde las matrices  $X$  (espectral) e  $Y$  (analito) se descomponen en:

$$X = TP^T + E \quad (\text{Ec. 1.5})$$

$$Y = UQ^T + F \quad (\text{Ec. 1.6})$$

Donde las matrices  $T$  y  $U$  son, respectivamente, las matrices de *scores* de  $X$  e  $Y$ . Las matrices  $P^T$  y  $Q^T$  son las matrices de *loadings* de  $X$  e  $Y$ , y  $E$  y  $F$  son las matrices residuales de  $X$  e  $Y$ , respectivamente. El objetivo del PLS es modelar las matrices  $X$  e  $Y$ , de tal forma que el conjunto de valores residuales,  $E$  y  $F$ , sean igual a cero.

En PLS, al igual que en PCA, se han de seleccionar el número de factores adecuado al sistema, recogiendo información cuantitativa pero sin recoger ruido o información espectral relativa a otros parámetros no relacionados con la calibración.

Una vez que se ha establecido el modelo de calibración correcto, es posible predecir el resultado para una nueva muestra o para un conjunto de muestras externo a la calibración. La correcta predicción de las nuevas muestras dependerá de la buena capacidad predictiva del modelo de calibración (Martens & Martens, 2000).

La eficiencia del modelo PLS está definida por el coeficiente de correlación  $r$ , el error normal de predicción [*Standard Error of prediction (SEP)*], la raíz media cuadrada del error de calibración [*Root Mean Square Error of Calibration (RMSEC)*] y la Raíz Media Cuadrada del Error en la validación Cruzada [*Root Mean Square Error of Cross-Validation (RMSECV)*]. De esta manera, el modelo será eficiente cuando el valor de  $r$  sea alto y los de SEP, RMSEC y RMSECV bajos.

Una descripción más amplia de este proceso, puede ser encontrada en la literatura (Araujo-Andrade *et al.*, 2005).

El objetivo del PLS es, entonces, obtener un modelo en un espacio de menor dimensión capturando la máxima variación en  $X$  con el número mínimo de variables (PCA) y maximizando la correlación entre  $X$  e  $Y$ .

Es por todo esto que el énfasis del PLS es la predicción de las respuestas y no necesariamente la relación existente entre las variables.

### **Métodos de Validación**

La validación de un modelo de predicción está referida a su capacidad predictiva de datos desconocidos, que no han sido utilizados en la calibración del mismo. Este nuevo conjunto de datos recibe el nombre de “set de validación”, y es utilizado para validar el modelo calibrado bajo una situación real.

#### **1.1.4.3 Monitoreo de la síntesis de FOS mediante Espectroscopia de Infrarrojo por Transformadas de Fourier (FTIR)**

La cromatografía líquida de alta performance (HPLC) es el método de referencia para determinar la composición en mezclas de azúcares y su utilidad es incuestionable. No obstante, tecnologías como la Espectroscopía de Infrarrojo por Transformadas de Fourier (FTIR) son hoy en día técnicas

fiables para determinar las propiedades estructurales y físicas de carbohidratos. Debido a que esta técnica no requiere reactivos químicos externos, las muestras casi no requieren preparación y las pruebas analíticas no generan residuos peligrosos, la espectroscopía FTIR es sin duda una herramienta útil para determinar la composición de oligosacáridos y polisacáridos complejos de manera rápida y amigable con el medio ambiente (Coimbra *et al.*, 2002; Anjos *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2015). El uso de FTIR asociado al análisis multivariante ha permitido una determinación rápida de la composición de oligo y polisacáridos de diferentes productos, entre los que se encuentran diferentes azúcares comerciales (Kačuraková *et al.*, 2001), celulosa, pectinas (Fellah *et al.*, 2009), almidón, hemicelulosas, carrageninas, hialuronatos (Kačuraková *et al.*, 2001; Fellah *et al.*, 2009; Cozzolino *et al.*, 2014), frutas (Bureau *et al.*, 2009), cereales, miel (Anjos *et al.*, 2015) y extractos de vino (Coimbra *et al.*, 2002). Asimismo, el FTIR también ha sido utilizado para monitorear diferentes reacciones enzimáticas en las que intervienen azúcares, ya sea como sustratos o como productos (Schindler *et al.*, 1998; Chiş *et al.*, 2010; Baum *et al.*, 2013).

En lo que respecta a los FOS, el FTIR y el análisis multivariante se utilizaron para caracterizar cualitativamente FOS en las frutillas (Blanch *et al.*, 2012), cebada (Cozzolino *et al.*, 2014) y agave (Mellado-Mojica & López, 2015). En un trabajo reciente, Trollope *et al.* (2014) utilizaron FTIR como indicador de la actividad de  $\beta$ -fructofuranosidasas de diferentes orígenes, para cuantificar el consumo de sacarosa. Más recientemente, el mismo grupo de investigación desarrolló modelos de calibración basados en cuadrados mínimos parciales (PLS) a partir de los espectros FTIR para el *screening* de bibliotecas de  $\beta$ -fructofuranosidasas generadas por mutagénesis aleatoria (Trollope *et al.*, 2015).

Considerando la robustez y la alta sensibilidad de la espectroscopía FTIR en combinación con el análisis multivariante para discriminar y asignar cambios pequeños en muestras complejas, en este capítulo se presentará el estudio de la síntesis enzimática de FOS a partir de sacarosa empleando cromatografía líquida de alta performance (HPLC) como método de referencia y se pondrá a punto el monitoreo de la síntesis mediante FTIR como alternativa al monitoreo clásico. Adicionalmente, considerando que la composición de los FOS determina tanto sus propiedades prebióticas como su capacidad para interactuar con las membranas lipídicas, y que la composición está a su vez determinada por las condiciones de síntesis, se analizará el efecto del sustrato sobre la composición de los oligosacáridos obtenidos.



## OBJETIVOS

- Modular la composición de FOS obtenidos mediante síntesis enzimática ajustando la concentración inicial de sacarosa usada en la síntesis.
- Definir y validar modelos basados en el análisis multivariante para determinar, a partir de los espectros FTIR, la composición de los FOS durante la síntesis.

El trabajo experimental se realizó parcialmente en el Centro Regional de Estudios en Alimentos Saludables (CREAS; Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile) bajo la dirección de la Prof. Dra. Elvira Zuñiga-Hansen.



# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1.3.1 Síntesis de FOS

Para la síntesis de los oligosacáridos se prepararon soluciones de sacarosa de concentraciones entre 20 y 60% en agua destilada. Como catalizador se usó la preparación enzimática *Viscozyme L* (Novozyme, Dinamarca) (56 UF/mL; UF: unidades fructosiltransferasa) concentración final 4 % v/v. Una UF se define como la cantidad de enzima requerida para transferir 1 mol de fructosa por minuto a pH 5.5, temperatura 50 °C y 100 rpm de agitación. El volumen de cada mezcla de reacción fue de 15 mL. Las síntesis se realizaron en frascos Erlenmeyer a una temperatura de 50 ± 1 °C con agitación (100 rpm). El pH se ajustó a 5.5 con NaOH 2 M. Se tomaron muestras luego de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 y 24 h de incubación. Las reacciones de síntesis se detuvieron por calentamiento de los productos obtenidos (jarabes) a 100 °C durante 2 minutos. La composición de los oligosacáridos se analizó por HPLC. Se consideraron los siguientes parámetros:

- **Conversión de sacarosa (X)**: representa el consumo porcentual de la sacarosa inicial durante la reacción de síntesis (Ec. 1.7):

$$X = [(S_0 - S)/S_0] \times 100 \quad \text{Ec.1.7}$$

donde  $S_0$  y  $S$  representan la concentración inicial y final de sacarosa, respectivamente.

- **Rendimiento [Y DP(n)]**: representa el porcentaje de sacarosa inicial convertido en FOS de un determinado grado de polimerización (DP) luego de un tiempo determinado de síntesis.

$$Y_{DPn} = [DPn/S_0] \times 100 \quad \text{Ec. 1.8}$$

donde  $DP_n$  representa la masa de FOS de grado de polimerización  $n$  producida y  $S_0$  representa la masa inicial de la sacarosa. De manera similar se calcularon los rendimientos de la glucosa ( $Y_{glu}$ ), que es un producto secundario de la síntesis de FOS, y de la fructosa ( $Y_{fruct}$ ), que es la unidad de intercambio durante la síntesis.

### 1.3.2 Análisis de la composición de los productos de síntesis mediante HPLC

La composición de los FOS obtenidos se analizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) en un equipo Perkin-Elmer Series 200 (Massachusetts, Estados Unidos) provisto de un detector de índice de refracción e inyector automático. Se incluyó como control una mezcla comercial de FOS (Orafti Beneo p95, Mannheim, Alemania). Una vez colectadas, las muestras se diluyeron 1:20 en agua milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Darmstadt, Alemania) y se filtraron a través de membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore Durapore, Billerica, MA, Estados Unidos).

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna para carbohidratos BP-100 Ag<sup>+</sup> (300  $\times$  7.8 mm) (Benson polymeric, Reno, NV, Estados Unidos). La temperatura de la columna y la del detector se mantuvieron a 50 y 40 °C, respectivamente. Para la elución se usó agua milli-Q (fase móvil) a una velocidad de flujo de 0.4 mL/min. Para determinar los tiempos de retención y comprobar el intervalo lineal de las mediciones, se incluyeron estándares externos de fructosa, glucosa, sacarosa, 1-kestosa (DP3), nistosa (DP4) y 1<sup>F</sup>-fructofuranosilnistosa (DP5). Los cromatogramas se integraron utilizando el software PeakFit (versión 4.12, SYSTAT Software Inc., San José, California, Estados Unidos).

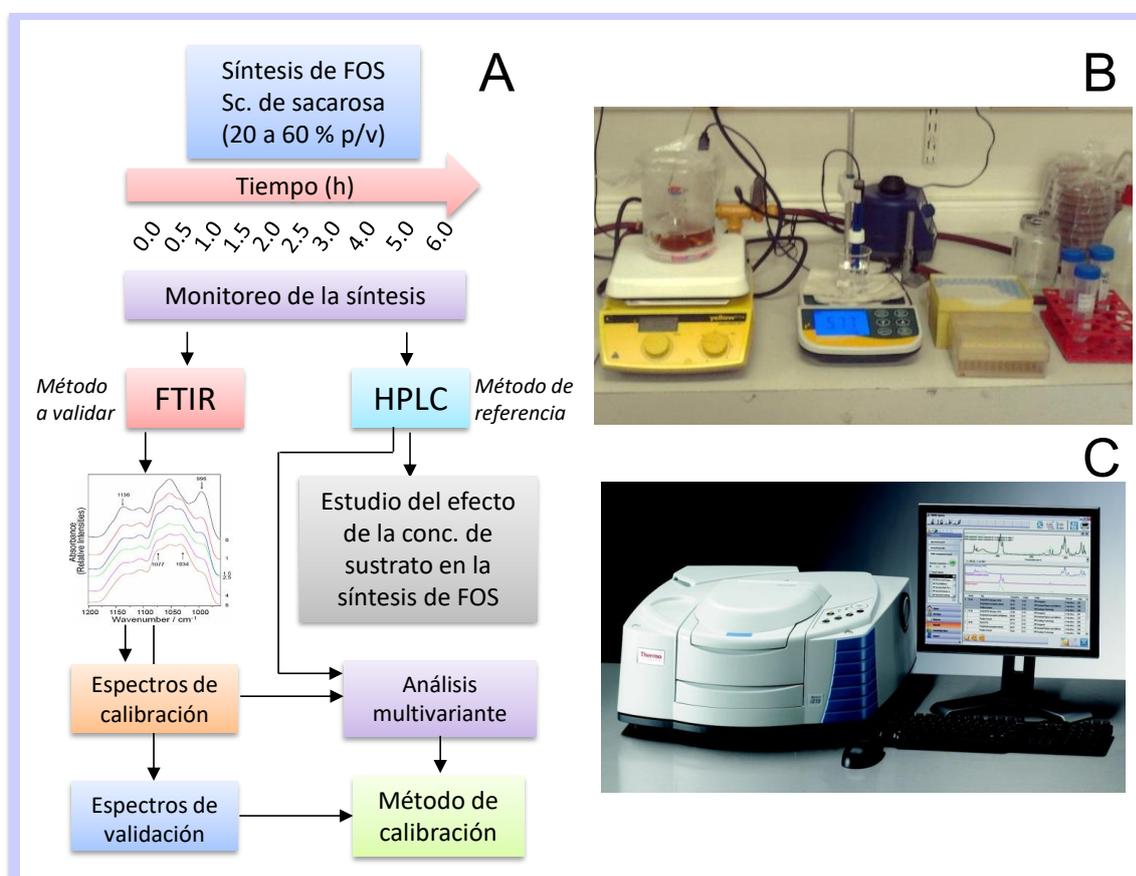
La composición de las muestras se determinó suponiendo que el área de cada pico es proporcional al porcentaje en peso del azúcar correspondiente con respecto a la masa total de azúcares (Boon *et al.*, 1999). Para corroborar tal suposición se realizó un balance de materia.

### 1.3.3 Análisis de la composición de los productos de síntesis mediante FTIR

En paralelo a las determinaciones por HPLC, la síntesis se monitoreó mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR). Con tal fin, las muestras colectadas a lo largo de las síntesis fueron transferidas a viales de 5 mL, congeladas durante 48 h a -80 °C, secadas por liofilización durante 48 h a 0.04 mbar de presión de vacío utilizando un equipo Heto FD4 (Heto Lab., Dinamarca), y mantenidas en desecadores en una atmósfera de sílica gel hasta su análisis. Un protocolo similar al descrito se llevó a cabo para soluciones estándar (20 % p/v) de FOS DP3, DP4 y DP5, sacarosa, glucosa y fructosa.

Los espectros FTIR se registraron en el rango 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  en pastillas de KBr, las cuales fueron preparadas mezclando 1 mg de muestra liofilizada y 200 mg de KBr. Para cada muestra, se registraron al menos seis espectros en modo de transmisión. Cada espectro resultó del promedio de 64 escaneos con una resolución espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Se registraron no menos de 10 espectros por muestra a analizar. La adquisición de datos se realizó con el *software* OMNIC (versión 8.3, Thermo Scientific, MA, Estados Unidos) en un espectrómetro Nicolet Thermo iS10 (Thermo Scientific, MA, Estados Unidos).

En el Esquema 1.1 se presenta el diseño propuesto para el estudio de la síntesis de FOS y el equipamiento utilizado.



**Esquema 1.1.** (A) Esquema de trabajo para el estudio de la síntesis de FOS a partir de sacarosa y la puesta a punto del monitoreo por FTIR. (B) Equipo armado para la síntesis de FOS, constituido de un agitador con calefacción en el cual se colocó un vaso de precipitado de 500 mL con agua desionizada y una sonda de temperatura. En el mismo se ubicaron los matraces donde se realizó la síntesis (50 °C, 100 rpm). El pH se monitoreó durante toda la reacción mediante un pHmetro (a la derecha en la imagen). (C) A lo largo de la reacción se tomaron alícuotas y se analizaron mediante un espectrómetro FTIR.

#### 1.3.4 Análisis multivariante

Se realizó un análisis multivariante sobre los espectros FTIR obtenidos a partir de las muestras recogidas a distintos tiempos durante la síntesis de FOS. Previo al procesamiento de los datos, se realizaron los siguientes pre-tratamientos espectrales: *mean centering correction* (corrección centrada de la media, MSC) y *extended multiplicative scatter correction* (corrección multiplicativa de la difusión, EMSC), utilizando el software Unscrambler® (versión 10.2, CAMO, Noruega). Se calibraron seis modelos diferentes de PLS para determinar la composición porcentual de DP3, DP4, DP5, glucosa, fructosa y sacarosa en las mezclas de reacción (Martens, & Næs 1989; Esbensen 2005). Para calibrar cada uno de los seis modelos, se utilizaron 117 espectros FTIR. Los espectros utilizados en la calibración correspondieron a diferentes síntesis (realizadas usando diferentes concentraciones iniciales de sacarosa y a experimentos independientes, y fueron seleccionados tratando de cubrir todo el rango de concentraciones de azúcares. La composición de FOS estimada mediante el análisis por HPLC se utilizó como método de referencia para definir los modelos de PLS. La exactitud y robustez de los modelos calibrados se determinaron en función de su coeficiente de correlación  $R^2$  y sus errores de calibración y predicción (RMSEC y RMSEP). La validación de los modelos fue realizada de manera independiente, utilizando 119 espectros diferentes a los usados en la calibración.

#### 1.3.5 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por duplicado usando tres síntesis independientes. Las diferencias relativas fueron reproducibles independientemente de la síntesis analizada. El análisis de varianza (ANOVA) se llevó a cabo utilizando el programa estadístico Infostat v2009 (UNC, Córdoba, Argentina). La comparación de medias se realizó aplicando el test de medias LSD de Fisher. Para valores de  $p < 0.05$  las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas.

## RESULTADOS

### 1.4.1 Análisis de la síntesis de FOS mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

Como método de referencia para el análisis de las reacciones de síntesis se usó HPLC. Se determinó la composición de FOS (DP3, DP4 y DP5), de los productos secundarios (glucosa y fructosa) y del sustrato remanente (sacarosa).

### 1.4.2 Efecto de la concentración de sacarosa inicial

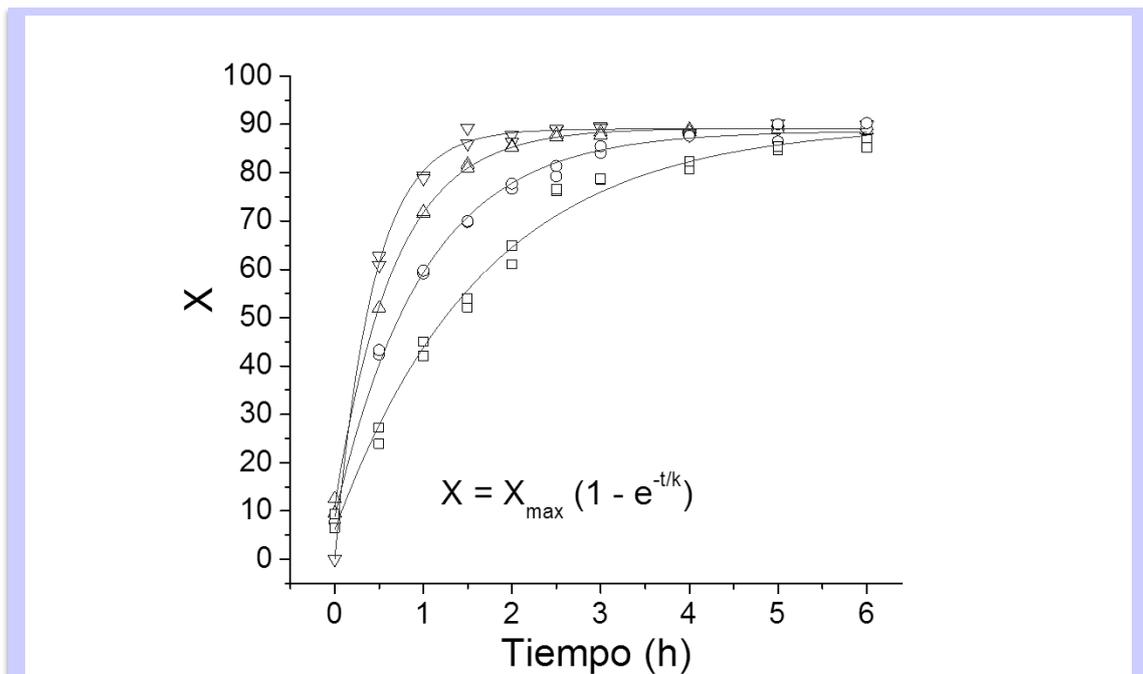
Para modular la composición de oligosacáridos en los productos obtenidos, se ensayaron concentraciones iniciales de sacarosa de 10, 20, 40 y 60 % p/v. Se observó que para cada tiempo de reacción, a mayor concentración de sacarosa inicial, menor el porcentaje de conversión del sustrato ( $X$ ) (Figura 1.10). El comportamiento exponencial de los datos experimentales permitió modelar  $X$  en función del tiempo según la Ecuación 1.9:

$$X = X_{\max} (1 - e^{-t/k}) \quad \text{Ec. 1.9}$$

donde  $X$  es la conversión de sacarosa en un tiempo de reacción dado (definida según la Ecuación 1.7 de la sección 2.2.1),  $X_{\max}$  es la conversión máxima de sacarosa,  $t$  es el tiempo de reacción y  $k$  es la constante de decaimiento del sustrato.  $X_{\max}$  está determinado por la cinética de formación y/o hidrólisis de los productos de reacción (ver Discusión).

A partir del modelado matemático de los datos experimentales de la conversión de sustrato, se obtuvieron los valores para  $X_{max}$  y  $k$  para cada concentración inicial de sacarosa (Tabla 1.2).

Debido a que la concentración inicial de sacarosa no dio lugar a diferencias significativas en los valores de  $X_{max}$  ( $p>0.05$ ) (Figura 1.10), se tomó el valor promedio de  $X_{max}$  ( $89.21\pm 0.56$ ) para determinar los valores  $k$  de cada reacción (Tabla 1.2).



**Figura 1.10.** Porcentaje de conversión de sacarosa (X) en función del tiempo, obtenido a partir de diferentes concentraciones iniciales de sacarosa. Los círculos indican 60 % p/v de sacarosa inicial; cuadrados, 40 % p/v; triángulos hacia arriba, 20 % p/v; triángulos hacia abajo, 10 % p/v. o: Los puntos representan los valores experimentales (cada ensayo se realizó por duplicado). Las curvas en rojo resultan del modelado matemático de los puntos experimentales.

Los valores calculados de  $k$  para cada concentración fueron ajustados mediante una regresión lineal (Figura 1.11), de acuerdo a la Ecuación 1.10:

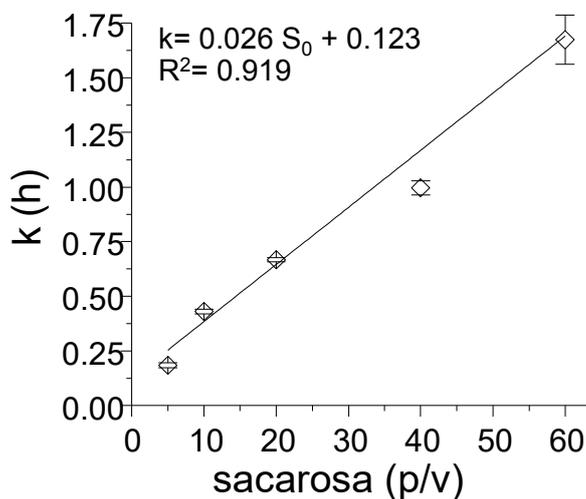
$$k = 0.026 S_0 + 0.123 \quad \text{Ec. 1.10}$$

donde  $k$  es la constante de decaimiento del sustrato (sacarosa) y  $S_0$  es la concentración inicial de sacarosa en % p/v. A partir de los valores de  $k$  es posible determinar la conversión de sacarosa (X) para cualquier concentración inicial de este azúcar entre 10 y 60 % p/v y para cualquier tiempo de reacción, usando la Ecuación 1.9.

**Tabla 1.2** Conversión máxima de sacarosa ( $X_{max}$ ) para las concentraciones iniciales de sacarosa ensayadas. Los valores de  $X_{max}$  se obtuvieron usando la regresión exponencial  $X = X_{max} (1 - e^{-t/k})$  (Ec. 1.9)<sup>1</sup>.

Sacarosa (% p/v)	$X_{max}$	$k$	$R^2$
10	89.09±0.87	0.184±0.012	0.99820
20	89.20±0.21	0.430±0.009	0.99933
40	88.60±0.62	0.667±0.032	0.99632
60	89.97±1.82	1.674±0.112	0.98834
Promedio	89.21 ± 0.56		

<sup>1</sup> $X$  es la conversión de sacarosa,  $X_{max}$  conversión máxima de sacarosa,  $t$  tiempo de reacción y  $k$  es la constante de decaimiento del sustrato.



**Figura 1.11.** Constante de decaimiento del sustrato ( $k$ ) en función de la concentración de sacarosa inicial.

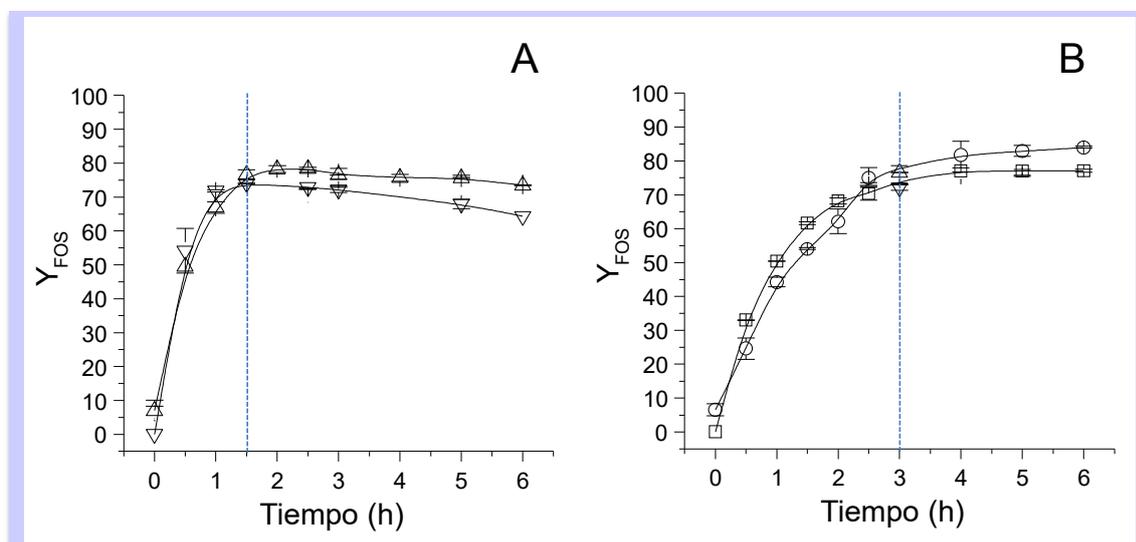
### 1.4.3 Rendimientos de las síntesis de FOS

#### 1.4.3.1 FOS totales

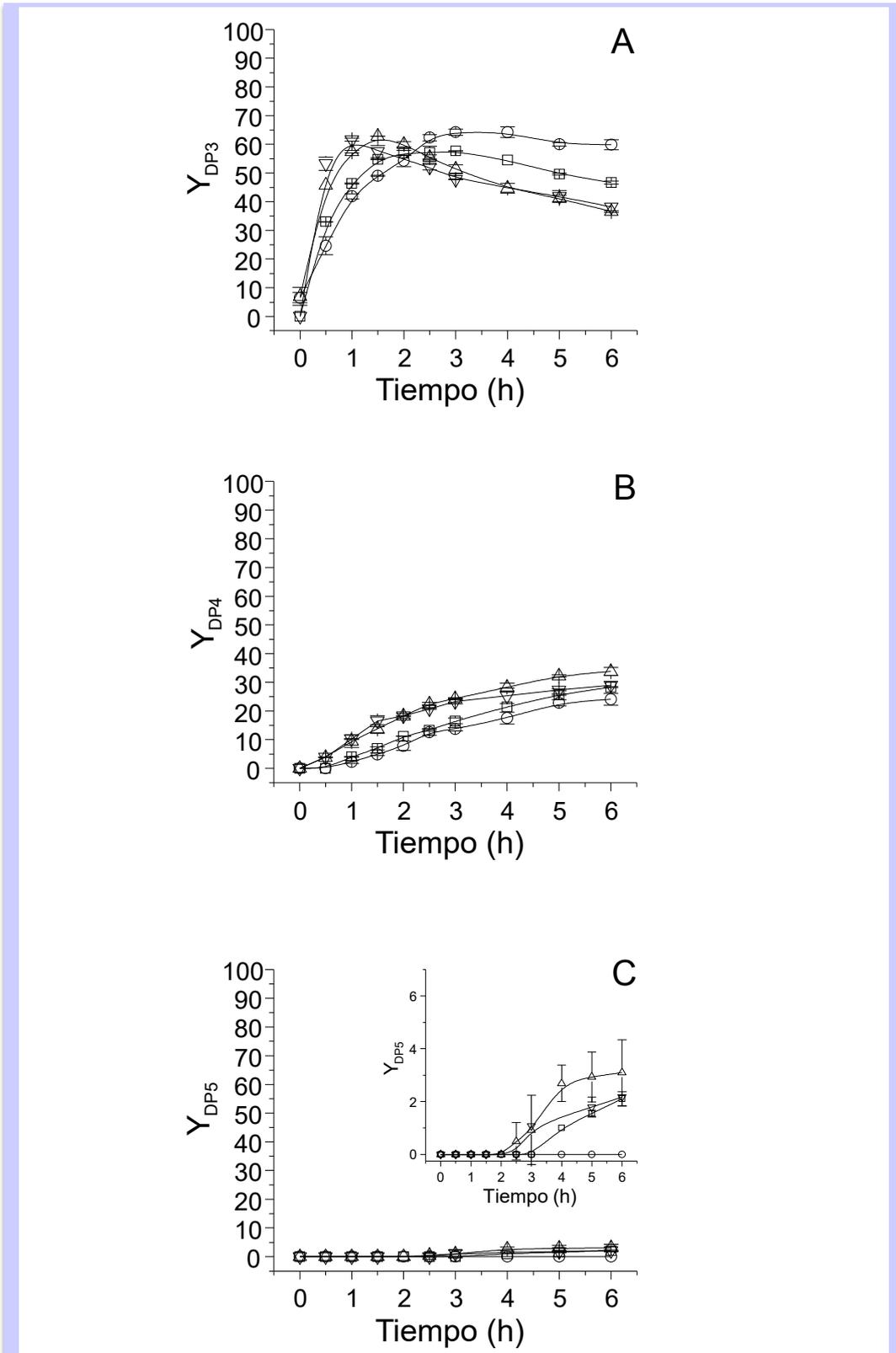
El rendimiento de los FOS totales ( $Y_{FOS}$ ) mostró dos patrones diferentes. Al realizar la síntesis de FOS con bajas concentraciones iniciales de sacarosa (10 y 20 % p/v) el  $Y_{FOS}$  máximo se alcanzó después de 1.5 h de reacción, disminuyendo ligeramente a tiempos de reacción mayores (Figura 1.12 A). Al realizar la síntesis de FOS con altas concentraciones iniciales de sacarosa (40 y 60% p/v), el  $Y_{FOS}$  máximo se alcanzó después de 3 h, y luego se estabilizó hasta el final de la reacción (6 h) (Figura 1.12 B). No se observaron diferencias estadísticamente significativas para los  $Y_{FOS}$  máximos alcanzados en las distintas condiciones ( $p > 0.05$ ).

#### 1.4.3.2 DP3, DP4 y DP5

El análisis de los  $Y_{DP3}$ ,  $Y_{DP4}$  y  $Y_{DP5}$  durante la reacción mostró que DP3 fue el oligosacárido producido con mayor eficiencia independientemente de la concentración inicial de sacarosa (Figura 1.13A, B y C). Aunque el  $Y_{DP3}$  máximo no fue significativamente diferente para las distintas condiciones de síntesis ( $p > 0.05$ ), cuanto menor fue la concentración inicial de sacarosa, más rápido se alcanzó el  $Y_{DP3}$  (Figura 1.13A). La similitud en el patrón observado para  $Y_{DP3}$  y  $Y_{FOS}$  (Figura 1.12A y B, respectivamente) indica que el  $Y_{DP3}$  es el principal determinante del  $Y_{FOS}$ .

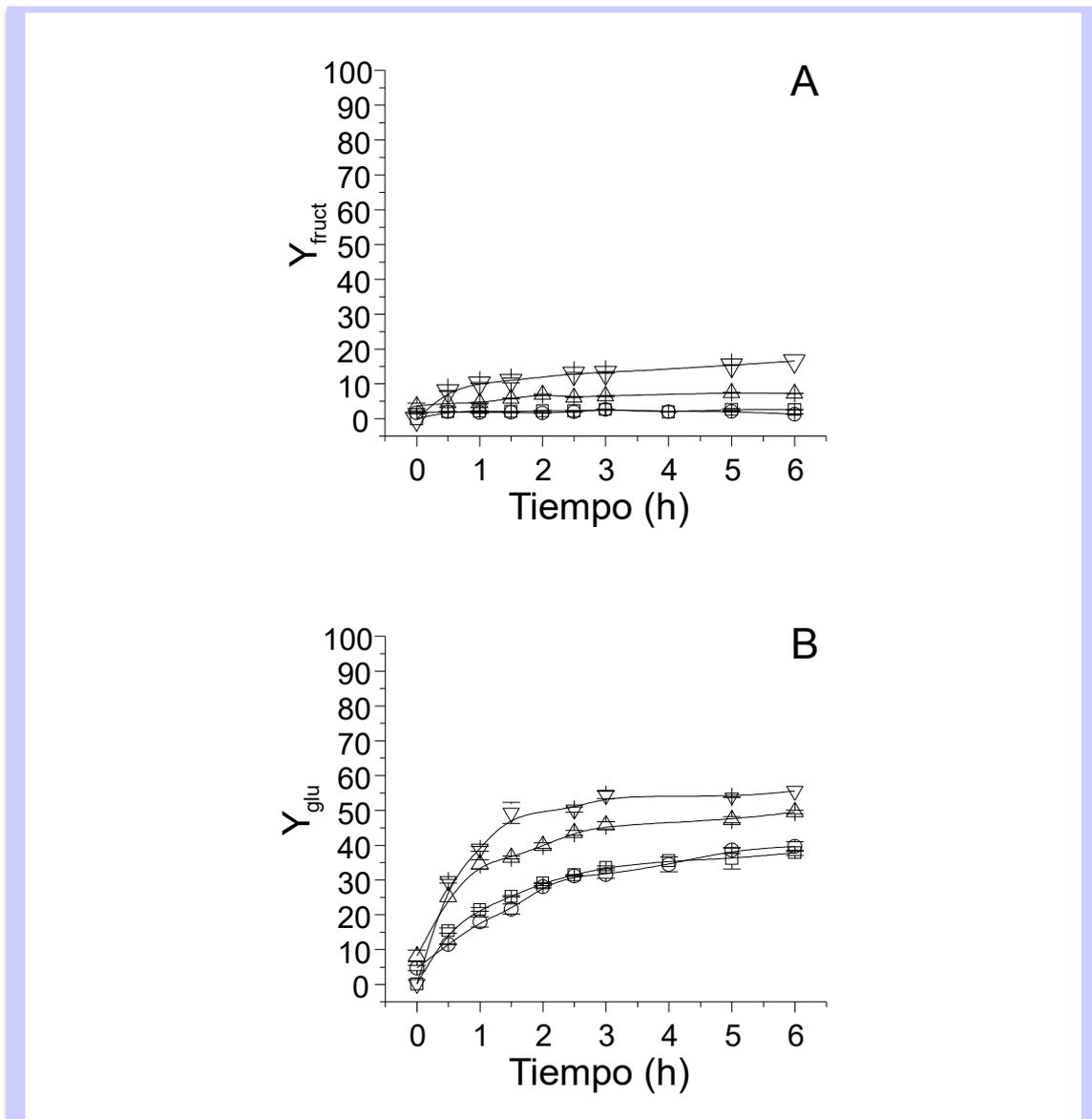


**Figura 1.12.** Rendimiento de FOS totales ( $Y_{FOS}$ ) en función del tiempo de síntesis, para diferentes concentraciones iniciales de sacarosa.  $Y_{FOS}$  está expresado en gramos de FOS/100 g de sacarosa. Los FOS totales incluyen DP3, DP4 y DP5. **A.** Bajas concentraciones iniciales de sacarosa: triángulos hacia abajo, 10 % p/v; triángulos hacia arriba, 20 % p/v. **B.** Altas concentraciones iniciales de sacarosa: cuadrados, 40 % p/v; círculos 60 % p/v.



**Figura 1.13.** Rendimiento (Y) de los oligosacáridos de cadena corta en función del tiempo de síntesis, a partir de diferentes concentraciones iniciales de sacarosa. El rendimiento está expresado en gramos de DP(n)/100 g de sacarosa, donde (n) indica el número de subunidades. Los círculos indican 60 % p/v de sacarosa inicial; los cuadrados, 40 % p/v; los triángulos hacia arriba, 20 % p/v; los triángulos hacia abajo, 10 % p/v. **A:**  $Y_{DP3}$ ; **B:**  $Y_{DP4}$ ; **C:**  $Y_{DP5}$ .

La producción de DP4 comenzó a aumentar a mayores tiempos de reacción, alcanzando el máximo después de 6 h de incubación para todas las concentraciones de sacarosa investigadas. Asimismo, DP4 fue producido de manera más eficiente cuando se usaron concentraciones bajas de sacarosa inicial (10 y 20% p/v; triángulos hacia arriba y abajo, respectivamente en la Figura 1.13B). Finalmente, la producción de DP5 comenzó aún más tarde que la de DP4 (Figura 1.13C). El  $Y_{DP5}$  fue más bien bajo, ya que en ninguna de las condiciones ensayadas superó 3 g DP5/100 g de sacarosa.



**Figura 1.14.** Rendimiento (Y) de los monosacáridos en función del tiempo de síntesis, utilizando diferentes concentraciones iniciales de sacarosa. El rendimiento está expresado en gramos de fructosa o glucosa/100 g de sacarosa. Los círculos indican 60 % p/v de sacarosa inicial; los cuadrados, 40 % p/v; los triángulos hacia arriba, 20 % p/v; los triángulos hacia abajo, 10 % p/v. **A:**  $Y_{fruct}$ ; **B:**  $Y_{glu}$ .

Además, es importante destacar que no se observó la producción de este oligosacárido cuando se partió de 60 % p/v de sacarosa inicial (máxima concentración ensayada), al menos hasta las 6 h de tiempo de síntesis.

#### 1.4.4 Rendimiento de productos secundarios de reacción (Glucosa y Fructosa)

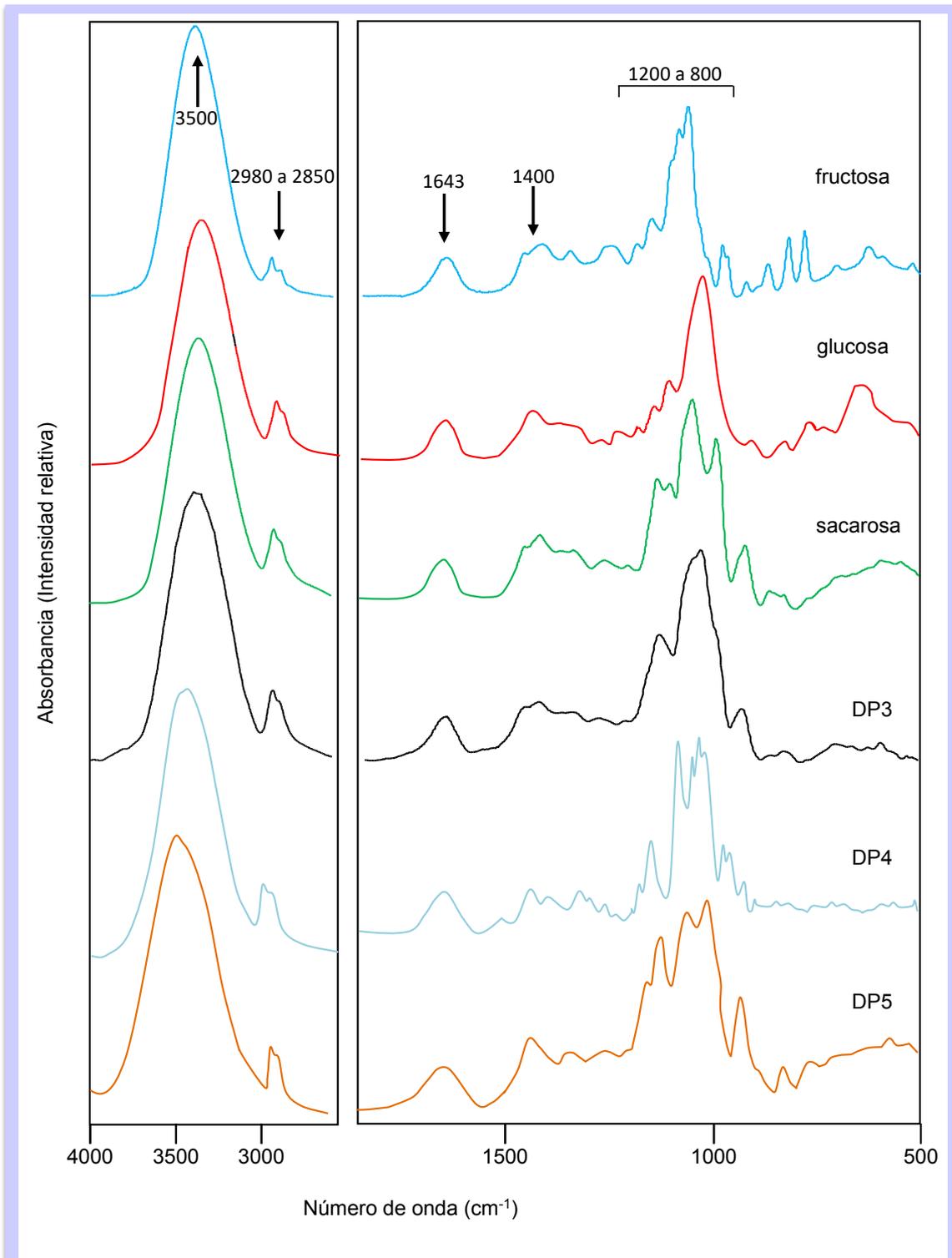
Además de FOS, las reacciones de transfructosilación condujeron a la formación de fructosa y glucosa como productos secundarios. El  $Y_{\text{fruct}}$  permaneció más o menos constante y por debajo de 15 g fru/100 g de sacarosa en todas las condiciones ensayadas (Figura 1.14A).

Asimismo, el  $Y_{\text{glu}}$  máximo fue de aproximadamente 30 g glu/100 g de sacarosa, y se obtuvo luego de 6 h de incubación cuando se partió de 40 y 60 % p/v de sacarosa inicial. Cuando se partió de concentraciones bajas de sacarosa inicial, el  $Y_{\text{glu}}$  fue notablemente mayor (alrededor de 40-50 g glu/100 g de sacarosa) (Figura 1.14B).

#### 1.4.5 Análisis de la síntesis de FOS mediante Espectroscopia de Infrarrojo por Transformadas de Fourier (FTIR)

##### 1.4.5.1 Espectros FTIR de los azúcares puros

Los espectros FTIR obtenidos para la glucosa pura, sacarosa, fructosa, DP3, DP4 y DP5 fueron los típicos observados en carbohidratos, y presentaron una gran similitud en la mayor parte de las regiones (Figura 1.15). Se observó una banda intensa a  $\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a los modos vibracionales de estiramiento (*stretching*) de los grupos hidroxilos ( $\nu\text{OH}$ ). En la región 2980 a  $2850 \text{ cm}^{-1}$  se observaron las bandas correspondientes a los modos vibracionales *stretching* de los grupos -CH ( $\nu\text{CH}$ ). La banda a  $1643 \text{ cm}^{-1}$  fue atribuida a las moléculas de agua ligadas a la matriz amorfa de azúcar, y el grupo de bandas a  $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ , a los modos vibracionales de flexión (*bending*) de los grupos -CH ( $\delta\text{CH}$ ) (Figura 1.15) (Santos *et al.*, 2014). Las mayores diferencias entre los espectros se observaron en la región denominada "*fingerprint*" de los azúcares ( $1200 \text{ a } 800 \text{ cm}^{-1}$ ) (Santos *et al.*, 2014), una región que presenta un complejo patrón de bandas, atribuidas esencialmente a los modos vibracionales de los enlaces glicosídicos C-O-C,  $\delta\text{COH}$  y el  $\nu\text{C-C}$ . Si bien es difícil asignar los modos vibracionales correspondientes a cada banda individual, las bandas observadas en esta región proporcionan en conjunto un patrón complejo que caracteriza de manera unívoca a cada azúcar analizado, permitiendo su identificación en muestras puras.

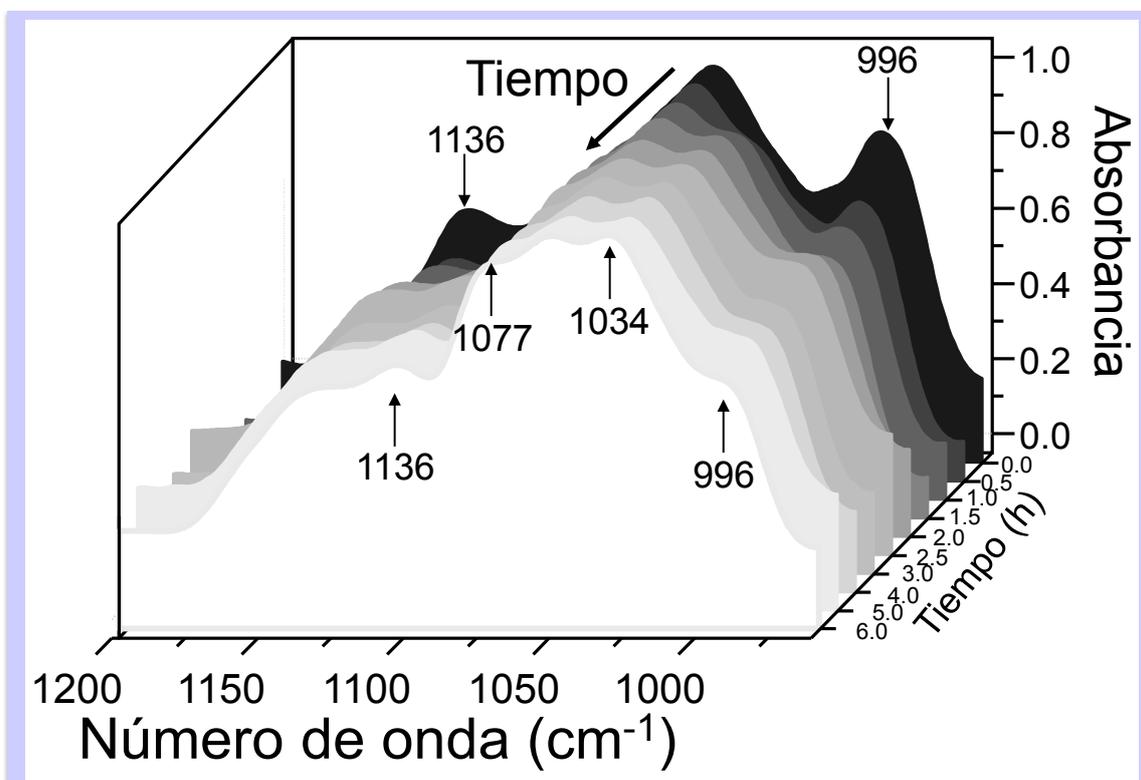


**Figura 1.15.** Espectros FTIR de la fructosa, glucosa, sacarosa, DP3, DP4 y DP5.

#### 1.4.5.2 Variación de los espectros durante la síntesis

La comparación de las regiones *fingerprint* de los espectros FTIR registrados a partir de muestras tomadas a distintos tiempos durante las reacciones enzimáticas, permite seguir claramente la

evolución de las mezclas de reacción. A tiempo 0, el espectro correspondió a la sacarosa pura (el sustrato inicial), y luego se pudo observar el consumo de sacarosa demostrado por la disminución de sus bandas características y la aparición de los diferentes productos de reacción (que dio lugar a la aparición de nuevas bandas, correspondientes a los diferentes FOS producidos) (Figura 1.16).

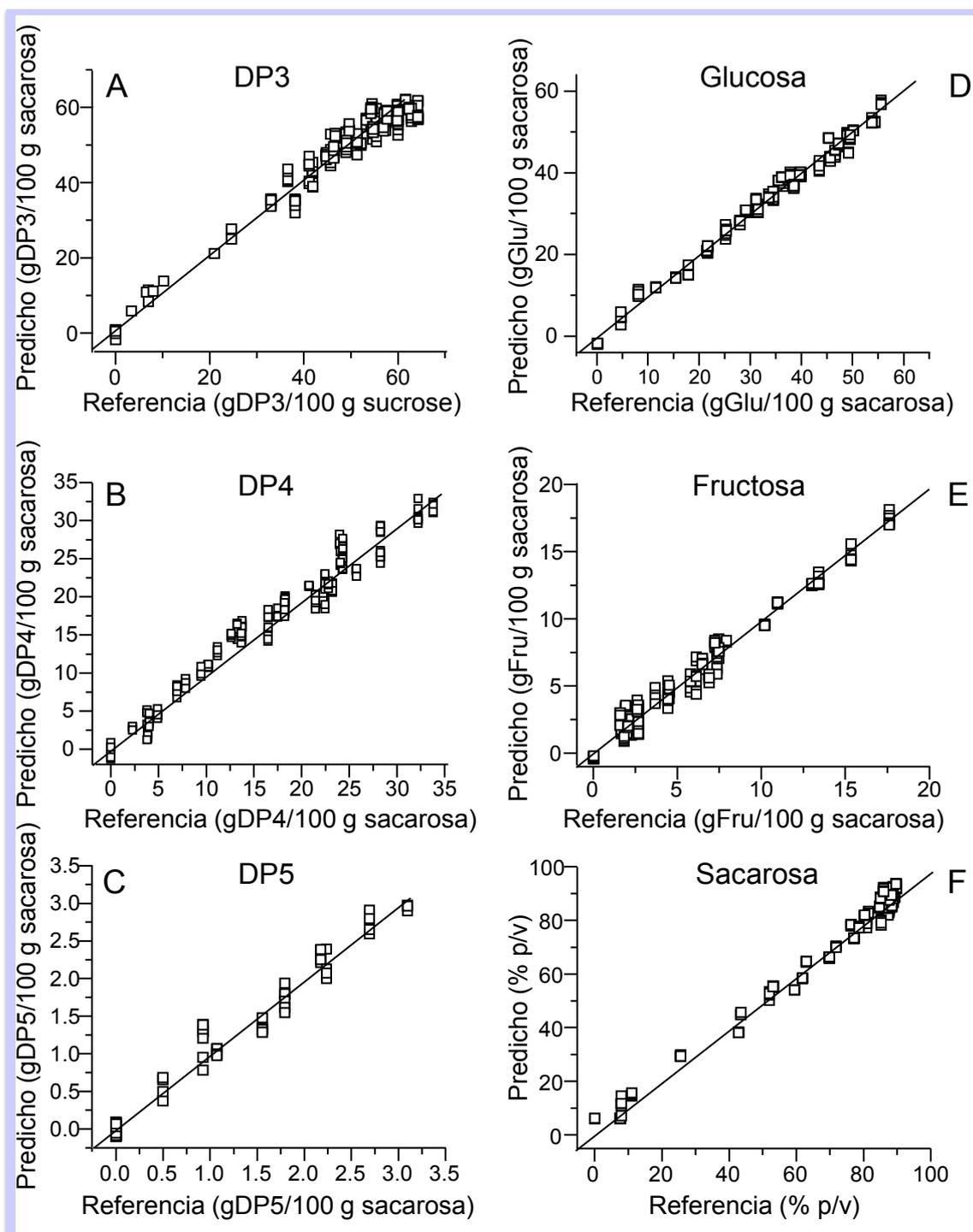


**Figura 1.16.** Evolución de los espectros de FTIR a lo largo de la síntesis de FOS en la región 1200-900  $\text{cm}^{-1}$ . Las flechas indican las bandas que aumentan y disminuyen a lo largo de la síntesis (bandas a 996 y 1136  $\text{cm}^{-1}$  para la sacarosa, y la banda a 1034 y el hombro a 1077  $\text{cm}^{-1}$ , para los FOS). Se muestran como ejemplo los espectros correspondientes a la síntesis a partir de 20 % p/v de sacarosa inicial.

Teniendo en cuenta que las mezclas de reacción están constituidas por diferentes proporciones de diferentes azúcares (DP3, DP4, DP5, glucosa, sacarosa, fructosa), los espectros obtenidos son el resultado de un complejo solapamiento de bandas. La Figura 1.16 muestra como ejemplo representativo, los resultados para la reacción enzimática llevada a cabo a partir de 20% p/v de sacarosa. En la Figura 1.16 se muestran las principales diferencias observadas durante la evolución de la reacción enzimática: la disminución de las bandas a 1136 y 996  $\text{cm}^{-1}$  características de la sacarosa pura (tiempo igual a 0), y el aumento de la banda a 1034 y del hombro a 1077  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a las mezclas de FOS (ver las flechas en la Figura 1.16).

### 1.4.5.3 Obtención de modelos PLS a partir de los espectros FTIR

Para determinar la concentración de DP3, DP4, DP5, fructosa, glucosa y sacarosa presente en las muestras, a partir de los espectros FTIR se definieron seis modelos PLS diferentes.



**Figura 1.17.** Valores predichos por los modelos PLS obtenidos a partir de los espectros FTIR en función de los valores de referencia obtenidos mediante HPLC de los productos de las reacciones enzimáticas. A: DP3; B: DP4; C: DP5; D: glucosa; E: fructosa; F: sacarosa remanente.

Los resultados obtenidos por HPLC se utilizaron como referencia. Todos los modelos PLS fueron calibrados usando 117 espectros y validados con un conjunto independiente de 119 espectros, registrados en las mismas condiciones (Figura 1.17A - F). Los valores medios predichos mostraron una muy buena correlación con los obtenidos por HPLC, lo que sustenta el uso de los modelos de PLS definidos para investigar muestras desconocidas.



## DISCUSIÓN

La composición de FOS en una mezcla está directamente relacionada con sus propiedades prebióticas y físico-químicas, y puede modularse mediante el ajuste de las condiciones de síntesis. En función de estos antecedentes, los resultados obtenidos en este capítulo pueden analizarse desde dos puntos de vista diferentes: a) el efecto de la concentración inicial de sacarosa sobre la composición de FOS, y b) la definición de modelos de cuantificación basados en FTIR y análisis multivariante para determinar la composición de los productos de las reacciones enzimáticas, incluyendo FOS de diferentes grados de polimerización (DP), glucosa, fructosa y sacarosa.

### **a) Efecto de la concentración inicial de sacarosa sobre la composición de FOS**

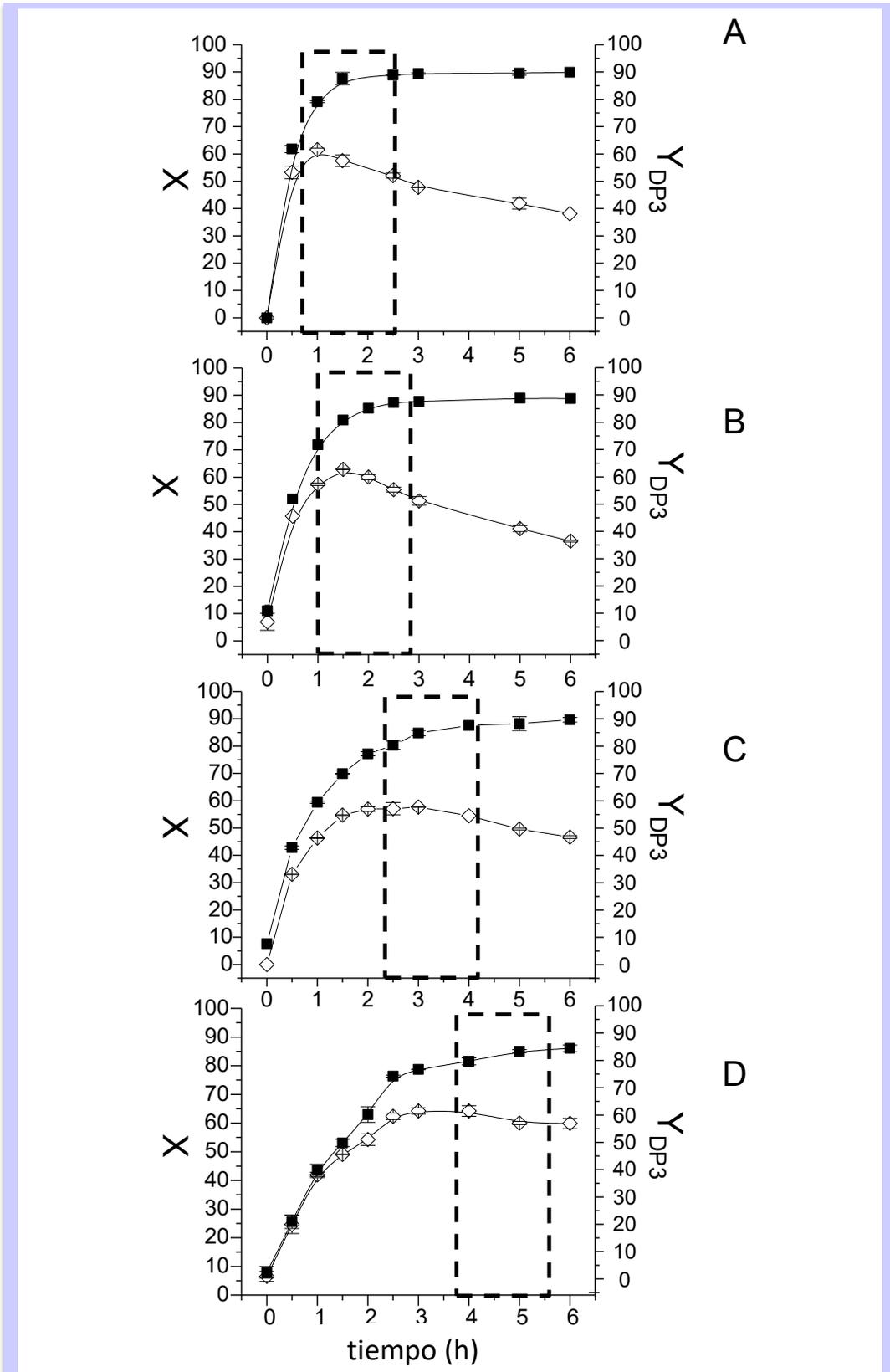
La composición de los FOS de cadena corta sintetizados en este capítulo estuvo fuertemente determinada por la concentración inicial de sacarosa, siendo DP3 el producto principal de síntesis en todas las condiciones ensayadas. DP3 es muy importante, tanto en términos de propiedades prebióticas (Crittenden & Playne, 2009) como en la interacción con membranas lipídicas (Hincha *et al.*, 2006, 2007). Por lo tanto, la determinación de las condiciones en las que su producción es máxima es de gran importancia para diseñar FOS con propiedades específicas.

El modelado de la conversión de sacarosa ( $X$ ) a lo largo del tiempo (Ec. 1.9 y 1.10) permitió determinar el tiempo mínimo necesario para alcanzar  $X_{\max}$  a partir de cualquier concentración de sacarosa comprendida entre 10 y 60% p/v. Para facilitar el análisis conjunto de  $X$  y  $Y_{DP3}$  durante la reacción, las Figuras 1.10 y 1.13A fueron fusionadas para construir la Figura 1.18. Esta última muestra que para todas las concentraciones de sacarosa iniciales ensayadas,  $Y_{DP3}$  comenzó a

disminuir una vez alcanzada  $X_{\max}$ . Por lo tanto, la determinación del parámetro  $t$  de las ecuaciones 1.10 y 1.11 es muy relevante, ya que proporciona información para optimizar la producción de DP3. En este capítulo se demostró que las mejores condiciones para obtener una relación DP3/DP4 alta fueron 10 % p/v de sacarosa inicial y una hora de tiempo de reacción. Para obtener una mayor proporción de DP4, las condiciones más adecuadas fueron 60 % p/v de sacarosa inicial y 4 h de incubación (Figuras 1.13A, B y 1.18).

Para analizar la evolución de reactivos y productos durante la reacción enzimática, se debe considerar que las transfructosilasas tienen normalmente dos actividades, **fructosiltransferasa** (que adiciona una molécula de hidrato de carbono a la cadena creciente) e **hidrolasa** (que adiciona una molécula de agua a la cadena creciente). Tal como se indicó en la introducción de este capítulo, la producción enzimática de FOS de cadena corta es un proceso complejo en el que las reacciones de síntesis y de hidrólisis se producen simultáneamente tanto en paralelo como en serie (Vega & Zuñiga-Hansen, 2014) (ver Esquema mecanismo ping pong Figura 1.2). En el trabajo de Jung *et al.* (1989) se llevaron a cabo síntesis enzimáticas independientes, a partir de sacarosa pura, DP3, DP4 y DP5. Los autores concluyeron que las reacciones de transfructosilación ocurridas durante las síntesis de FOS se producen a través de una serie consecutiva de reacciones desproporcionadas, en las cuales los FOS sintetizados en los primeros pasos actúan como donantes y aceptores de grupos fructosilos produciendo simultáneamente FOS con DP inmediatamente superior ( $DP_{n+1}$ ) e inferior ( $DP_{n-1}$ ) que los FOS que actuaron como reactivos.

Este mecanismo permite explicar la disminución del  $Y_{DP3}$  después de haber alcanzado su máximo. Cuando la disponibilidad de sacarosa (DP2) es alta, como ocurrió al principio de las cuatro síntesis ensayadas, la reacción enzimática se desplaza hacia la producción de DP3 ( $DP_{n+1}$ ), con liberación de glucosa ( $DP_{n-1}$ ). Una vez alcanzada  $X_{\max}$  para la sacarosa (Figura 1.18), DP3 actuó como donante y aceptor de un grupo fructosilo para producir DP4 (Vega & Zuñiga-Hansen, 2014). Como resultado de ello, y considerando que la sacarosa ya había sido mayormente consumida, no se produjo más DP3. En este sentido, diferentes autores informaron que DP4 no puede actuar como sustrato dador de grupos fructosilo cuando DP3 o la sacarosa aún están presentes en el medio de reacción (Nishizawa *et al.*, 2001; Vega & Zuñiga-Hansen 2014). Esto explica por qué  $Y_{DP4}$  comenzó a aumentar sólo cuando  $Y_{DP3}$  comenzó a disminuir (Figuras 1.13A y B). A su vez, DP4 también actúa como dador y aceptor de grupos fructosilo para producir DP5. En este capítulo, DP5 fue producido con mayor eficiencia cuando se partió de concentraciones iniciales de sacarosa bajas (10 y 20 % p/v) y la reacción se llevó a cabo durante más de 2.5 h. (Figuras 1.13B y C).



**Figura 1.18.** Comparación de las figuras 1.10 y 1.13A (conversión de sacarosa (X) y  $Y_{DP3}$  en función del tiempo para las diferentes concentraciones de sacarosa iniciales. Los cuadrados llenos indican X y los diamantes vacíos,  $Y_{DP3}$ . **A:** 10 % p/v de sacarosa inicial, **B:** 20 % p/v, **C:** 40 % p/v, **D:** 60 % p/v. Los recuadros en líneas de punto indican los tiempos en los que X alcanza  $X_{max}$  y  $Y_{DP3}$  comienza a disminuir.

Por el contrario, cuando se partió de concentraciones iniciales de sacarosa altas (40 y 60 % p/v), DP4 se sintetizó de manera menos eficiente (en términos de rendimiento) y, en consecuencia, la producción de DP5 también fue menos eficiente (Figuras 1.13B y C). Esto indica que la producción de DP5 estuvo determinada por la cinética de la síntesis de DP4.

Como se indicó en la sección 1.1.1 (**página 24**), las reacciones de transfructosilación ocurren simultáneamente con reacciones de hidrólisis. Como resultado de estas últimas, se genera glucosa como producto principal (Figura 1.14B), la cual, en altas concentraciones, inhibe las reacciones de transfructosilación (Vega & Zuñiga-Hansen, 2014). En este contexto, teniendo en cuenta que la concentración inicial de sacarosa determina la relación de transfructosilación/hidrólisis (Khandekar *et al.*, 2014), ésta se convierte en un parámetro importante para la modulación de la formación de FOS. Cuando se partió de concentraciones iniciales de sacarosa bajas (10 y 20 % p/v), se produjo el  $Y_{FOS}$  máximo al poco tiempo de iniciada la síntesis ( $t = 1.5$  h) (Figura 1.12A). La disminución de  $Y_{FOS}$  luego de alcanzado el valor máximo fue probablemente debida a la baja disponibilidad de sacarosa. Por otra parte, una disminución de la relación de transfructosilación/hidrólisis pudo dar lugar a la hidrólisis de los FOS, lo cual generó un aumento en la concentración de fructosa, y especialmente la de glucosa en el medio de reacción (Figura 1.14A y B). Tal como se discutirá en el capítulo II, para aumentar la pureza de los FOS sintetizados, y por lo tanto, sus propiedades prebióticas, la glucosa puede ser eliminada enzimáticamente con glucosa oxidasa (Vega & Zuñiga-Hansen, 2014) o mediante métodos cromatográficos (Nobre *et al.*, 2012). Sin embargo, cuando los FOS son sintetizados para proteger membranas lipídicas expuestas a procesos de deshidratación, la presencia de glucosa podría ser potencialmente útil, gracias a su capacidad de interactuar con la membrana lipídica (hipótesis de reemplazo de moléculas de agua).

#### **b) Definición de modelos de cuantificación basados en FTIR asociado a análisis multivariante para determinar la composición de los productos de transfructosilación.**

Los carbohidratos presentan bandas intensas en la denominada región *fingerprint* (1200 a 800  $\text{cm}^{-1}$ ) (Santos *et al.*, 2014). Esta región es rica en bandas derivadas de los modos vibracionales de los enlaces glicosídicos C-O-C ( $\delta\text{COH}$  y  $\nu\text{C-C}$ ), que proporcionan patrones únicos que caracterizan colectivamente muestras puras de azúcares (Figura 1.15). Los espectros de FTIR obtenidos a lo largo de las reacciones enzimáticas (Figura 1.16) corresponden a mezclas de azúcares, y son resultado de la sumatoria de las absorciones individuales de los distintos azúcares presentes. Como se indicó en la sección "Resultados", esto aumenta la complejidad de los espectros obtenidos y hace necesaria la utilización de métodos basados en el análisis multivariante para su interpretación completa sin pérdida de información relevante.

Por esta razón para las mezclas de reacción a los distintos tiempos de síntesis se calibraron y validaron de forma independiente seis modelos PLS, que demostraron ser muy robustos. Dichos modelos permitieron cuantificar simultáneamente los azúcares presentes en el medio de reacción, directamente a partir de los espectros FTIR, de una manera sencilla y económica, proporcionando información adicional acerca del rendimiento de los FOS sintetizados (Figura 1.17). Por ejemplo, la cuantificación de la sacarosa remanente en la mezcla de reacción (Figura 1.17F) proporciona una idea directa acerca de su conversión (X) (Figuras 1.10 y 1.17F) y puede ser útil para analizar la actividad transfructosilasa. La determinación de la concentración de glucosa (Figura 1.17D) proporciona información relacionada con la inhibición de las reacciones de transfructosilación. Asimismo, la concentración de cada uno de los FOS (y por lo tanto, sus proporciones relativas) está directamente relacionada con sus propiedades físico-químicas y prebióticas.

En resumen, los modelos de PLS definidos en este capítulo no están limitados a las condiciones de síntesis aquí utilizadas, sino que pueden ser utilizados para determinar la composición de FOS en otras muestras que contengan mezclas de sacarosa, glucosa, fructosa, DP3, DP4 y DP5. Esto incluye no sólo el seguimiento de la síntesis enzimática sino también la determinación de la composición de muestras desconocidas, lo cual tiene una clara aplicación en el control de calidad de la producción industrial de FOS.



## CONCLUSIONES

Si bien los FOS son conocidos ampliamente por sus propiedades prebióticas, les han sido atribuidas otras propiedades interesantes, entre las que puede mencionarse su papel como endulzantes no cariogénicos y bajos en calorías, o su capacidad para proteger membranas lipídicas durante procesos de deshidratación. Cada una de estas propiedades está principalmente relacionada con la composición de FOS en la mezcla de oligosacáridos.

En este contexto, los resultados presentados en este capítulo integran dos aspectos complementarios relacionados con la producción de FOS: la modulación de su síntesis enzimática y el desarrollo de modelos precisos para su cuantificación. La comprensión del efecto de la concentración inicial de sacarosa en la composición final de FOS permite el diseño de FOS para objetivos específicos.

Uno de los mayores retos para el uso de la espectroscopía FTIR en Ciencia y Tecnología de Alimentos es el desarrollo de modelos adecuados basados en el análisis multivariante para interpretar la enorme cantidad de información contenida en los espectros. Los modelos PLS desarrollados en este capítulo proporcionan una herramienta rápida, fiable y amigable con el medio ambiente tanto para monitorear la producción enzimática de FOS, como para realizar el control de calidad, de una manera mucho más simple y rápida que los métodos tradicionales, tales como el HPLC.

Teniendo en cuenta la importancia económica del mercado de los alimentos funcionales y considerando que la sacarosa es un *comodity* de bajo costo, el enfoque integrado desarrollado en este capítulo representa una herramienta útil y valiosa tanto a nivel académico como para la industria alimentaria.



## CAPÍTULO II

Fructo-oligosacáridos como protectores  
frente a la deshidratación de *Lactobacillus*  
*delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas ocupan un lugar importante en las industrias alimentaria y de biotecnología, ya que son ampliamente utilizadas como *starters* para la fabricación de alimentos o productos probióticos. Por esta razón, para reducir al mínimo la pérdida de la viabilidad y funcionalidad de los *starters*, se hace necesaria la optimización de tecnologías adecuadas de preservación, tanto en la cadena de producción y distribución, como en los alimentos que contienen dichos microorganismos. Por lo general, los métodos de preservación conllevan procesos de deshidratación, y tal como se mencionó en la Introducción general (página 10), la membrana es el primer sitio expuesto a la deshidratación. Si bien los microorganismos son capaces de reparar el daño a nivel de la membrana, es importante tener en cuenta que una membrana dañada deja de cumplir su función de permeabilidad selectiva y facilita el daño en otras estructuras internas de la bacteria, el cual en muchos casos es letal (Tymczyszyn *et al.*, 2007b). Por lo tanto, los daños producidos por la pérdida de agua llevan, en definitiva, a la pérdida de viabilidad bacteriana (Tymczyszyn *et al.*, 2008). Para evitar estos problemas, se torna imprescindible el uso de compuestos con capacidad protectora durante el proceso de deshidratación, siendo los azúcares los compuestos más usados para este propósito (Carvalho *et al.*, 2004). Tal como se indicó anteriormente (Introducción general páginas 10 y 12), existen dos hipótesis aceptadas para explicar el efecto protector de los azúcares. Una de ellas propone que los azúcares pueden reemplazar las moléculas de agua durante la deshidratación y mantener las estructuras biológicas en condiciones hidratadas (Crowe *et al.*, 1992; Leslie *et al.*, 1995; Santivarangkna *et al.*, 2008). La otra hipótesis se basa en la

capacidad de los azúcares para formar matrices vítreas (vitricación) en las cuales la alta viscosidad y la baja movilidad de las moléculas limitan las interacciones moleculares (Tymczyszyn *et al.*, 2011, 2012).

Teniendo en cuenta la naturaleza polihidroxiada de los FOS y la importancia de las bacterias lácticas en la industria alimentaria, en este capítulo se abordó el estudio de los FOS como protectores de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* durante procesos de deshidratación (*e.g.*, liofilización). El estudio se centró en la relación entre la composición de mezclas de FOS de diferente grado de polimerización obtenidas mediante síntesis enzimática y su efecto protector, tanto durante el proceso de liofilización como durante el almacenamiento en condiciones controladas de humedad relativa.

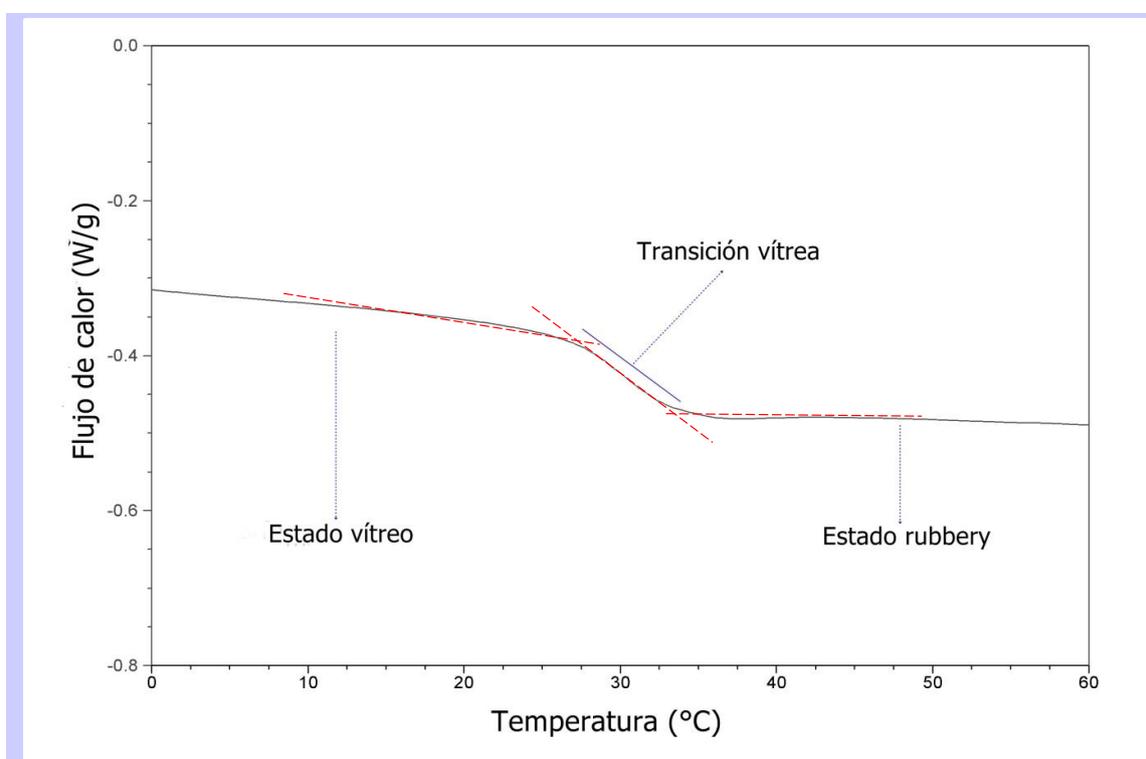
### 2.1.2 Transición vítrea

El estado vítreo se define como un estado líquido subenfriado de alta viscosidad, en el cual los movimientos rotacionales y vibratoriales están disminuidos (Lodato *et al.*, 1999; Tymczyszyn *et al.*, 2012; Golowczyc *et al.*, 2013). Por esta razón, durante el almacenamiento de células deshidratadas, una matriz en estado vítreo retrasa las reacciones de deterioro, que son dependientes de los movimientos moleculares. Por el contrario, el estado gomoso (*rubbery*) es un estado de menor viscosidad en el cual se pueden dar reacciones de deterioro, que llevan a la pérdida de actividad del material biológico. El pasaje del estado vítreo al estado *rubbery* se conoce como **transición vítrea** (ver introducción general página 12). Un parámetro relevante en el estudio del comportamiento *vítrea* de distintos compuestos, como por ejemplo azúcares, es la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), que es la temperatura a la cual ocurre la transición. El método comúnmente utilizado para determinarla es la calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Crowe *et al.*, 1998). En los termogramas, la  $T_g$  se observa como un cambio gradual en el flujo de calor debido al aumento en la capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ) de la muestra (Figura 2.1). El valor de  $T_g$  es altamente dependiente del contenido de agua de la muestra, siendo ésta la principal molécula plastificante (que disminuye la  $T_g$ ).

### 2.1.3 Preservación de microorganismos en estado vítreo

Se ha observado que cuando los microorganismos se deshidratan en presencia de azúcares y se almacenan a temperaturas inferiores a la  $T_g$  (es decir en estado vítreo), la inactivación es muy lenta. Por el contrario, si la temperatura de almacenamiento es superior a la  $T_g$ , la pérdida de viabilidad se acelera (Higl *et al.*, 2007).

La  $T_g$  depende de la estructura y del peso molecular de la muestra. Por lo tanto, los diferentes azúcares presentan diferentes valores de  $T_g$  para el mismo contenido de agua. Los azúcares de elevado peso molecular tienen una mayor  $T_g$ . Sin embargo, se ha informado que los disacáridos y trisacáridos son mejores protectores que algunos polisacáridos de mayor grado de polimerización, como la maltodextrina (Santivarangkna *et al.*, 2008). Este fenómeno se debe a que la hipótesis del reemplazo de moléculas de agua y la de vitrificación son complementarias (ver Introducción general, página 13). Es decir, los azúcares más pequeños pueden interactuar mejor con los grupos polares de las macromoléculas que protegen y los azúcares de mayor peso molecular, con mayor  $T_g$ , favorecen la estabilización del producto debido a su capacidad de formar estados vítreos (Tymczyszyn *et al.*, 2011).



**Figura 2.1.** Termograma (Flujo de calor vs Temperatura). Al aumentar la temperatura del compuesto ocurre la transición vítrea. Para determinar la  $T_g$  se traza una recta tangente a la curva de flujo de calor en la transición y se extrapola con la línea de base antes y después de la transición, obteniéndose el rango de temperatura correspondientes a la  $T_g$ .

#### 2.1.4 Fructo-oligosacáridos como protectores

Los FOS son ampliamente conocidos por sus propiedades prebióticas y por eso son utilizados en fórmulas infantiles y otros alimentos funcionales (Romano *et al.*, 2015). Sin embargo, su utilización como protectores de bacterias lácticas ha sido poco explorada.

Tal como se vio en el capítulo I de este trabajo de tesis, la síntesis enzimática de FOS a partir de sacarosa conduce a la obtención de mezclas que contienen FOS con grados de polimerización (DP) de 2 a 6, resultantes de la actividad transfructosilasa, junto con monosacáridos (fructosa y glucosa) resultantes de la actividad hidrolasa de las fructosiltransferasas comerciales (Crittenden & Playne, 2009). Teniendo en cuenta que la fructosa generada durante la síntesis de FOS es utilizada para obtener FOS de mayor DP, sus niveles son constantes y bajos durante toda la síntesis. Sin embargo, la glucosa obtenida no es utilizada y su concentración aumenta a lo largo de la síntesis, lo cual no es del todo conveniente ya que la glucosa acumulada es capaz de inhibir la reacción enzimática. En general, la glucosa remanente en el medio de reacción puede ser removida utilizando la enzima glucosa oxidasa o mediante métodos cromatográficos. De este modo se contribuye a aumentar el rendimiento de la producción de FOS, mejorando sus propiedades prebióticas (Vega & Zuñiga-Hansen, 2014).

En relación a la protección mediada por FOS, la interacción de FOS de cadena corta [por ejemplo, 1-kestosa (DP3), nistosa (DP4), 1<sup>F</sup>-fructofuranosilnistosa (DP5)] con membranas modelo (liposomas) demostró ser especie y tamaño dependiente. Asimismo, mezclas compuestas por fructanos de alto y bajo DP han demostrado tener una mayor capacidad protectora de membranas modelo (Hincha *et al.*, 2006, 2007; Vereyken *et al.*, 2001, 2002, 2003a, b). En bacterias lácticas, el efecto estabilizador de los FOS durante la liofilización y secado *spray* ha sido informado recientemente (Golowcyc *et al.*, 2011), aunque el efecto de la composición de FOS sobre la protección bacteriana no ha sido descrito aún.

## OBJETIVOS

En este capítulo se investigará el efecto protector de FOS de diferente composición, antes y después de la remoción de monosacáridos. Para ello se sintetizarán FOS de diferente composición, se removerá la glucosa presente en el medio de reacción y se investigará su efecto protector durante la liofilización y el almacenamiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333. Este abordaje permitirá comprender el rol de cada oligosacárido y la necesidad o no de remover la glucosa obtenida como producto secundario de reacción.

Par tal fin se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Sintetizar enzimáticamente FOS de diferente composición empleando sacarosa como sustrato inicial.
- Purificar las mezclas de FOS obtenidas (remover los mono y disacáridos) usando una columna de carbono activado.
- Determinar las  $T_g$  de las mezclas de FOS obtenidas, equilibradas a diferentes humedades relativas (HRs).
- Analizar el efecto protector de los FOS durante la liofilización mediante recuento de bacterias viables, determinación del tiempo de latencia (tiempo *lag*) a partir de cinéticas de acidificación (indicador de daño global), y determinación de la integridad de la membrana empleando dos sondas fluorescentes.
- Estudiar el efecto protector de los FOS durante el almacenamiento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 a diferentes HRs.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.3.1 Síntesis de FOS

Los FOS fueron sintetizados a partir de soluciones de sacarosa 40 % p/v tal como fue descrito anteriormente (Capítulo I sección 1.3.1). Las reacciones de síntesis se detuvieron por calentamiento de los productos obtenidos (jarabes) a 100 °C durante 2 minutos. Se tomaron muestras luego de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 y 24 h de incubación.

La composición de los FOS obtenidos se analizó mediante HPLC en un equipo Perkin-Elmer Series 200 (Massachusetts, Estados Unidos) provisto de un detector de índice de refracción e inyector automático, tal como se indicó anteriormente (Capítulo I sección 1.3.2).

### 2.3.2 Purificación de los FOS obtenidos mediante síntesis enzimática

**2.3.2.1 Preparación de la columna:** para la eliminación de los monosacáridos de las mezclas de FOS sintetizados se usó una columna cromatográfica, cargada con carbono activado como adsorbente (Figura 2.2). Antes de llenar la columna, se lavó 180 g de carbono activado para eliminar partículas finas y para llenar espacios de aire dentro del adsorbente, y se lo sometió a un ciclo de autoclave (1 atm, 121 °C durante 15 min). Una vez acondicionado el adsorbente se lo cargó en una columna de vidrio de 300 mm de largo × 44.8 mm de diámetro interno (IVA, Buenos Aires, Argentina). Posteriormente, la columna se cargó con agua Milli-Q, y el adsorbente fue agregado lentamente para evitar la formación de canales preferenciales. Para completar el

acondicionamiento, se bombearon 4 L de agua milli-Q con una bomba peristáltica (Gilson, Middleton, WI, Estados Unidos) con una velocidad de 25 mL/min (Figura 2.2).



**Figura 2.2.** Equipo para la purificación de FOS. Las mezclas de síntesis (Matraz de Erlenmeyer) fueron cargadas mediante recirculación con una bomba peristáltica en una columna de vidrio con carbono activado como adsorbente. La elución de los azúcares se realizó lavando la columna con soluciones de concentración creciente de etanol en agua.

**2.3.2.2 Purificación de los FOS:** las reacciones (volumen: 100 mL) fueron detenidas mediante inactivación de las enzimas con calor (100 °C durante 5 min) una vez completado el tiempo predefinido de síntesis (sección 2.3.1). La mezcla de reacción fue enfriada a 0 °C en un baño, se agregó 100 mL de agua destilada (dilución necesaria para centrifugar) y se centrifugó a 10000 × g y 4 °C durante 15 min para separar las enzimas desnaturalizadas de la solución. El sobrenadante (jarabe de FOS clarificado) fue cargado en la columna de carbono activado, haciéndolo recircular con una velocidad de flujo de 18 mL/min hasta alcanzar el equilibrio entre el adsorbente y la fase móvil

(aproximadamente 3 h) (Figura 2.2). Para eliminar los azúcares no adsorbidos, principalmente los monosacáridos, se lavó la columna con 6 L de agua milli-Q con un flujo de 18 mL/min.

Para desorber la fracción de mono y disacáridos presentes en las mezclas se lavó la columna con un gradiente creciente de concentración de etanol: 1 L 2.5 % v/v y 1 L 5 % v/v (estas fracciones se desecharon). Para la elución de los FOS se incrementó la concentración de etanol: 1 L 15 % v/v y 2 L 20 % v/v (estas fracciones se conservaron). La carga, lavado y elución de los azúcares se realizó a 25 °C.

Las fracciones con las mezclas purificadas de FOS se evaporaron a 60 °C en un rotavapor (Büchi, Flawil, Suiza), para eliminar el etanol y concentrar los azúcares. Las mezclas (jarabes de FOS purificados) se analizaron y cuantificaron por HPLC, tal como se explicó en la (Capítulo I sección 1.3.2). Finalmente, se congelaron a -80°C y se liofilizaron.

### **2.3.3 Determinación de las temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ )**

Se prepararon soluciones 20 % p/v de los FOS sintetizados (purificados y sin purificar), de una mezcla comercial de FOS, y de sacarosa. 1 mL de cada solución se transfirió a un vial de vidrio de 5 mL y se lo congeló a -80 °C durante 48 h. Posteriormente, las muestras se liofilizaron en un equipo de liofilización Heto FD4 (Heto Lab, Dinamarca). La temperatura del condensador fue de -50 °C y la presión de la cámara, de 0.04 mbar. El proceso de secado duró 48 h.

Para la determinación de las  $T_g$ , se colocó 5 mg de cada muestra liofilizada en cápsulas de DSC abiertas, que fueron equilibradas en recipientes herméticos que contenían sales saturadas de LiCl,  $KCH_3COO$  y  $MgCl_2$ , hasta alcanzar el equilibrio (aproximadamente 7-10 días), para generar atmósferas de 11, 22 y 33% de humedad relativa, respectivamente. Al momento de las determinaciones, las cápsulas se sellaron con una prensa manual. Los ensayos se realizaron en un calorímetro Q100 (TA Instruments, New Castle, DE, Estados Unidos) calibrado con indio, plomo y zinc. El protocolo de corrida incluyó dos ciclos. En el primer ciclo se trabajó con una temperatura inicial de -20°C, que se mantuvo constante durante 2 min, y luego se calentó a una velocidad de 20 °C/min hasta 90 °C. Este primer ciclo fue necesario para borrar la historia térmica de la muestra. En el segundo ciclo se trabajó con una temperatura inicial de -20°C, que se mantuvo constante durante 2 min. Posteriormente se calentó con una velocidad de 10 °C/min hasta 110 °C, y luego se determinó la  $T_g$ . Se usó una cápsula vacía como referencia. Cada determinación se realizó al menos dos veces. La desviación estándar para la  $T_g$  medida fue de  $\pm 1$  °C.

### **2.3.4 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento**

Se trabajó con la cepa *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333, aislada de un starter comercial (Gómez-Zavaglia et al., 1999). La cepa *stock* se preservó congelada a -80 °C en leche descremada (120 g/L de sólidos). Se seleccionó esta cepa por ser altamente sensible a los procesos de deshidratación.

### **2.3.5 Liofilización**

#### **2.3.5.1 Preparación de las muestras**

Se trabajó con cultivos en fase estacionaria crecidos en caldo MRS (Difco, Detroit, MI, Estados Unidos) (De Man *et al.*, 1960) a 37 °C incubado *overnight* (hasta una concentración aproximada de  $5.5 \times 10^8$  UFC/mL). Las bacterias se cosecharon por centrifugación a  $4000 \times g$  durante 10 min, y se lavaron dos veces con H<sub>2</sub>O destilada estéril para eliminar restos de medio de cultivo. Para los ensayos de protección frente al daño por liofilización, el pellet de bacterias se resuspendió en soluciones 20 % p/v de:

- FOS sintetizados (antes o después de purificar),
- FOS comerciales,
- sacarosa

Los pellets de bacterias del control sin protección se resuspendieron en NaCl 0.85 % p/v.

Las soluciones fueron previamente esterilizadas por filtración con filtros estériles de 0.22 µm.

#### **2.3.5.2 Procedimiento de liofilización**

Se transfirió a un mililitro de cada suspensión (bacterias + azúcares) a viales de vidrio de 5 mL y se congeló en nitrógeno líquido (-196 °C). La liofilización se llevó a cabo en un equipo Heto FD4 (Heto Lab, Dinamarca), en las condiciones descritas en la sección 2.,3.3.

### **2.3.6 Determinación del tiempo de latencia**

Los microorganismos liofilizados fueron rehidratados en 1 mL de NaCl 0.85 % p/v a 25 °C, inoculados al 2 % en caldo MRS e incubados a 37 °C. Se determinó el pH cada 60 min para cada condición ensayada.

### 2.3.7 Determinación del daño de la membrana

Luego de la liofilización de las bacterias en presencia de los diferentes azúcares, las muestras se rehidrataron según lo descrito en la sección 2.3.6. Para los ensayos de citometría de flujo se prepararon suspensiones celulares de  $1 \times 10^6$  bacterias/mL en NaCl 0.85 % p/v. Se determinó el daño de la membrana celular con el kit LIVE/DEAD BacLight® (Thermo Fisher, Waltham, MA Estados Unidos), el cual permite evidenciar el daño a través de la permeabilidad diferencial de las sondas yoduro de propidio (PI) y SYTO. Se agregaron 50  $\mu$ L de la sonda SYTO 9 (66.8  $\mu$ M) y 50  $\mu$ L de yoduro de propidio (400  $\mu$ M) a 900  $\mu$ L de cada suspensión. La concentración final de las sondas fue de 3.34  $\mu$ M y 20  $\mu$ M para SYTO 9 y PI, respectivamente. Las muestras se incubaron durante 2 min a 25 °C en oscuridad.

Las determinaciones se llevaron a cabo en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, Estados Unidos) utilizando el software CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA, Estados Unidos). Para cada muestra se colectaron 10000 eventos, la velocidad de eventos fue menor a 300 eventos/s. La intensidad de señal de los canales se recogió en escala logarítmica. El canal FL1 (530/30 nm) se utilizó para establecer la fluorescencia verde de SYTO 9 y el canal FL3 (650 nm), para ajustar la fluorescencia roja de PI. Como controles se usaron células totalmente dañadas por un tratamiento térmico (80 °C y agitación por 30 min) (100 % dañadas) y células recién cosechadas (100 % vivas).

Para la determinación de las poblaciones se establecieron tres regiones: Q1 (bacterias dañadas y muertas): PI+ y SYTO 9-; Q2 (restos celulares): PI- y SYTO9-; y Q3 (bacterias viables): PI- y SYTO9+. El porcentaje de cada población se determinó como  $[i/(Q1+Q3)] \times 100$ , donde i es Q1 o Q3 (Hiraoka *et al.*, 2002).

### 2.3.8 Almacenamiento

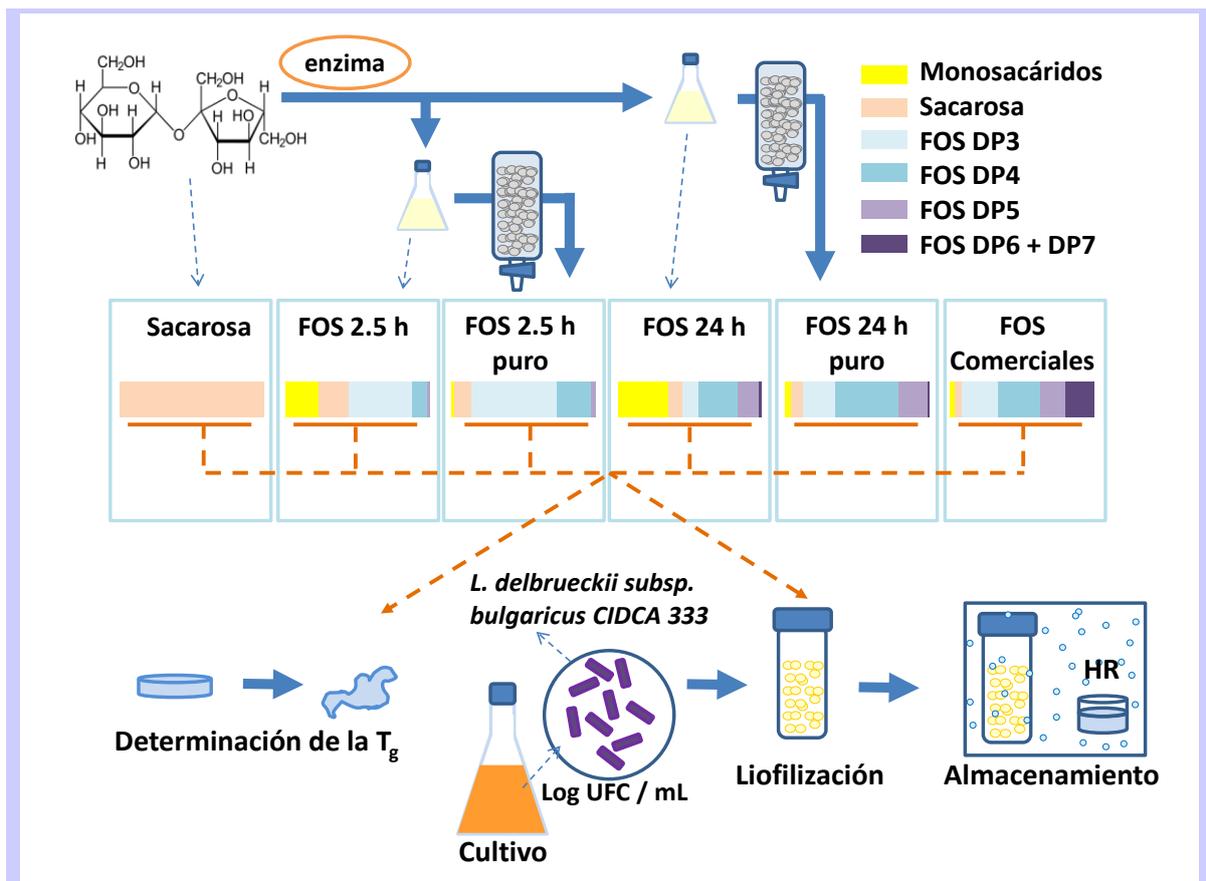
Las muestras liofilizadas (sección 2.3.5) fueron almacenadas durante 90 días a 4 °C en recipientes herméticos en presencia de soluciones saturadas de LiCl, KCH<sub>3</sub>COO o MgCl<sub>2</sub>, que generaron atmósferas de HRs de 11, 22 y 33%, respectivamente. La viabilidad bacteriana se determinó inmediatamente después de la liofilización, después del equilibrio a las diferentes HRs (aproximadamente 7-10 días), y durante el almacenamiento a intervalos de 15 días. Para cada condición, las muestras se rehidrataron en 1 mL de NaCl 0.85 % p/v. Las suspensiones se diluyeron en serie, se sembraron en agar MRS, y se incubaron a 37 °C durante 48 h en aerobiosis.

### **2.3.9 Análisis estadístico**

Los experimentos se realizaron por duplicado. Las diferencias relativas fueron reproducibles independientemente del cultivo utilizado. Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con el programa Infostat v2009 (UNC, Córdoba, Argentina). La comparación de medias se realizó aplicando el test de medias LSD de Fisher. Para valores de  $p < 0.05$  las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas.

## RESULTADOS

El objetivo de este capítulo fue evaluar el papel de los mono- y oligosacáridos presentes en las mezclas de fructo-oligosacáridos (FOS) como agentes protectores durante la liofilización y almacenamiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333. En una primera etapa se obtuvieron diferentes mezclas de FOS por síntesis enzimática a partir de sacarosa, y posteriormente se las purificó por remoción de los monosacáridos producidos como productos secundarios. Luego se determinó las temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ) a 11, 22 y 33% de humedad relativa (HR). En un siguiente paso se resuspendieron cultivos frescos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 en fase estacionaria en soluciones de las diferentes mezclas obtenidas al 20 % p/v. Las suspensiones fueron posteriormente liofilizadas y se determinó la viabilidad bacteriana inmediatamente después del proceso, y durante el almacenamiento en atmósfera controlada a 4 °C y 11, 22 y 33% HR. En el Esquema 2.1 se representa el estudio planteado.



**Esquema 2.1.** Representación de los ensayos desarrollados para el estudio del efecto protector de los FOS. Los FOS inicialmente sintetizados a partir de sacarosa, fueron posteriormente purificados por cromatografía en una columna de carbono activado. Los FOS purificados y sin purificar presentaron diferente composición de mono- y oligosacáridos. Los azúcares fueron caracterizados termofísicamente mediante la  $T_g$  y empleados como protectores durante la liofilización de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333. Finalmente, se realizó un estudio de la estabilidad microbiana durante el almacenamiento bajo atmosfera controlada a 4 °C.

#### 2.4.1 Síntesis enzimática, purificación y selección de los FOS para preservación

La composición de los FOS obtenidos a lo largo de la síntesis enzimática se presenta en la Tabla 2.1. Debido a que varios de los productos de síntesis presentaron composiciones similares, para los estudios posteriores se seleccionaron los productos obtenidos luego de 2.5 y 24 h de reacción, por ser las mezclas con las mayores diferencias en su composición. En la Tabla 2.1 se presenta la composición de dichos FOS a lo largo de la síntesis.

La purificación de los FOS obtenidos por síntesis se realizó empleando una columna de carbono activado. El principio de separación radica en la capacidad de los azúcares para adsorberse selectivamente en el carbono activado, siendo los de mayor peso molecular los que presentan mayor adsorción (Nobre *et al.* 2011).

**Tabla 2.1.** Composición de los FOS (% p/p) obtenidos por síntesis enzimática a partir de sacarosa 40 % p/v usando *Viscozyme L* como biocatalizador.

Azúcar	tiempo de reacción (h)										
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5*	3.0	4.0	5.0	6.0	24*
Monosacáridos	0	11	15	18	21	23	24	26	26	27	35
Sacarosa	100	61	43	32	24	21	16	13	13	11	10
DP3	0	25	35	41	43	44	44	41	38	35	11
DP4	0	0	3	5	8	10	12	16	19	21	27
DP5	0	0	0	0	0	2	0	0.8	1.2	1.6	15
DP6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2

\* FOS seleccionados para los ensayos de preservación.

La concentración total de FOS antes de la purificación en ambas reacciones de síntesis fue de 55-56 %, y 86-87% luego de la misma (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2.** Composición de los FOS (% p/p) usados como protectores.

	Síntesis				Comercial
	2.5 h	2.5 h (puro)	24 h	24 h (puro)	
Monosacáridos (%)	23	2	35	4	3
Sacarosa (%)	21	12	10	9	5
DP3 (%)	44	59	11	22	25
DP4 (%)	10	24	27	44	29
DP5 (%)	2	3	15	20	18
DP6 (%)	0	0	2	1	14
DP7 (%)	0	0	0	0	6
FOS totales (%)	56	86	55	87	92

Luego de 2.5 h de síntesis, los FOS presentes en la mezcla de reacción fueron principalmente DP3 y DP4. Por su parte, en la síntesis de 24 h se produjeron principalmente DP3, DP4 y DP5, en una proporción de *ca.* 1:2:1. En esta última condición de síntesis se produjeron también pequeñas cantidades de DP6. La composición de FOS comerciales fue más heterogénea, siendo DP3 y DP4 los componentes principales, con una menor contribución de DP5 y DP6, y pequeñas cantidades de DP7 (Tabla 2.2).

#### 2.4.2 Determinación de las temperaturas de transición vítrea

En la Figura 2.3 y la Tabla 2.3 se muestran las temperaturas de transición vítrea de los FOS estudiados y de la sacarosa, luego de ser equilibrados a 11, 22 y 33 % de HR. Como era esperable, los valores de  $T_g$  disminuyeron a medida que se incrementó la humedad relativa. La purificación de las mezclas de FOS dio lugar a un marcado incremento de las  $T_g$  a todas las HRs. Los FOS purificados obtenidos luego de 24 h de síntesis fueron los que mostraron los valores más altos de  $T_g$ . Por su parte, los FOS purificados a partir de la síntesis de 2.5 h presentaron valores de  $T_g$  ligeramente inferiores, similares a los de los FOS comerciales. En todos los casos, los valores de  $T_g$  de los FOS purificados y comerciales fueron mayores que los de la sacarosa, para las tres HRs estudiadas.

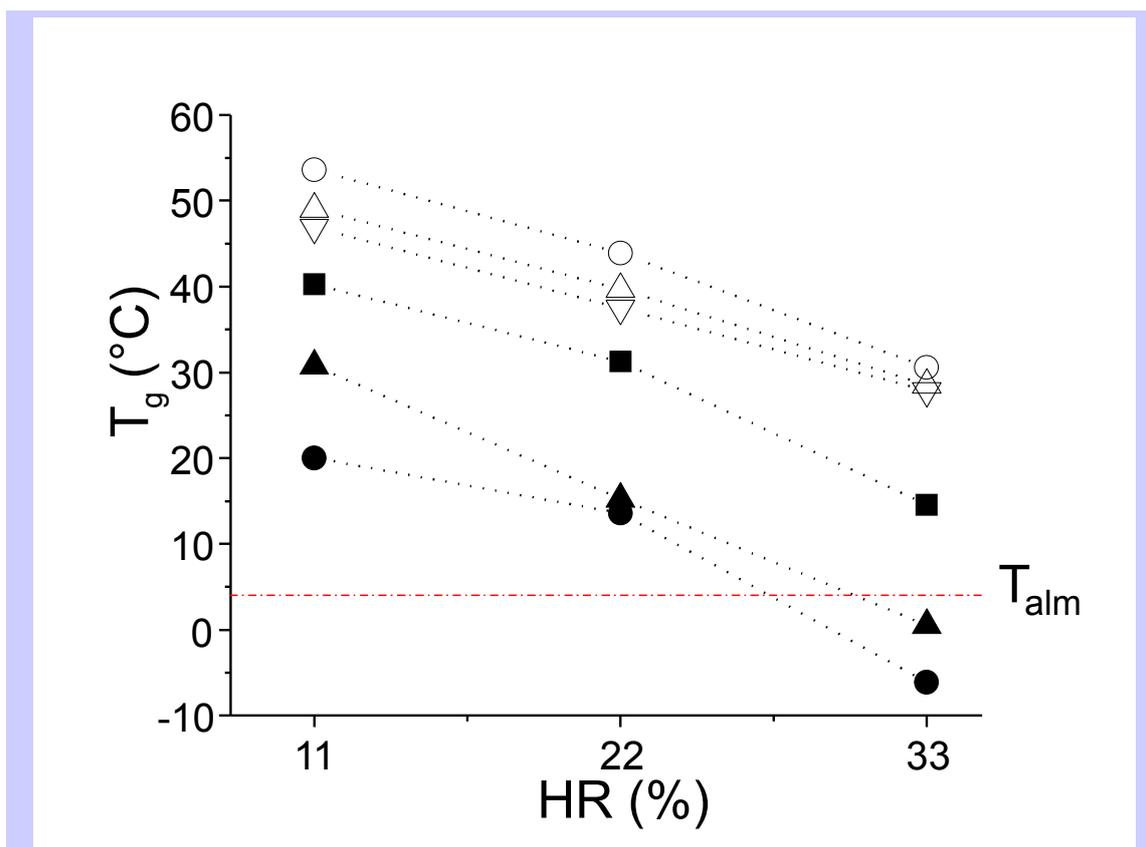
**Tabla 2.3.** Temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ) de las mezclas de FOS y de la sacarosa a diferentes humedades relativas (HRs).

FOS/sacarosa	HR (%)		
	11	22	33
2.5 h	30.79 °C	15.28 °C	0.56 °C
2.5 h (puro)	49.06 °C	39.72 °C	28.55 °C
24 h	20.06 °C	13.60 °C	-6.10 °C
24 h (puro)	53.65 °C	43.92 °C	30.58 °C
comercial	46.92 °C	37.49 °C	27.88 °C
sacarosa	40.28 °C	31.28 °C	14.58 °C

Los valores de  $T_g$  obtenidos para los FOS sin purificar (2.5 h y 24 h) equilibrados a 33% de HR fueron inferiores a 4 °C ( $T_{alm}$ ), la temperatura seleccionada para el almacenamiento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 (Figura 2.3 y Tabla 2.3).

#### 2.4.3 Efecto protector de las mezclas de FOS durante la liofilización de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333

*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 fue liofilizado en soluciones 20 % p/v de las diferentes mezclas de FOS o de sacarosa. En la Figura 2.4 se muestran imágenes de los microorganismos liofilizados en presencia de los azúcares estudiados. Luego de la liofilización se obtuvieron matrices amorfas.



**Figura 2.3.** Temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ) de los azúcares estudiados a 11, 22 y 33 % HR. Los símbolos representan: FOS obtenidos a partir de 2.5 h de síntesis, purificados (triángulos vacíos hacia arriba) o no (triángulos llenos hacia abajo); FOS obtenidos a partir de 24 h de síntesis, purificados (círculos vacíos) o no (círculos llenos); FOS comerciales (triángulos vacíos hacia abajo), sacarosa (cuadrados llenos). La desviación estándar para la  $T_g$  medida fue de  $\pm 1$  °C.  $T_{alm}$  es la temperatura de almacenamiento (4 °C) de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 liofilizada en soluciones de los azúcares estudiados.

La viabilidad bacteriana y el daño en la membrana fueron determinados inmediatamente después del secado y se muestran en la Tabla 2.4. Se incluyeron como controles microorganismos no liofilizados (cultivo fresco) y microorganismos liofilizados en presencia de NaCl 0.85 % p/v (sin protección).

Para la determinación del daño en la membrana se usó el kit de sondas fluorescentes BaLight® que emplea las sondas SYTO 9 y ioduro de propidio (PI). El SYTO 9 atraviesa la membrana, difunde pasivamente al interior de las bacterias y se une al ADN dando una fluorescencia verde. El PI también se une al ADN, dando una fluorescencia roja, pero no atraviesa la membrana intacta. Esto significa que el PI sólo ingresará a la bacteria cuando la membrana esté dañada. Cuando ambas sondas están en el interior de la célula, la emisión de SYTO 9 es extinguida por el PI, observándose una fluorescencia roja. Así, las bacterias con la membrana intacta serán SYTO 9+ PI- (verdes), aquellas con la membrana parcialmente dañada serán SYTO 9+ PI+, y las bacterias con las

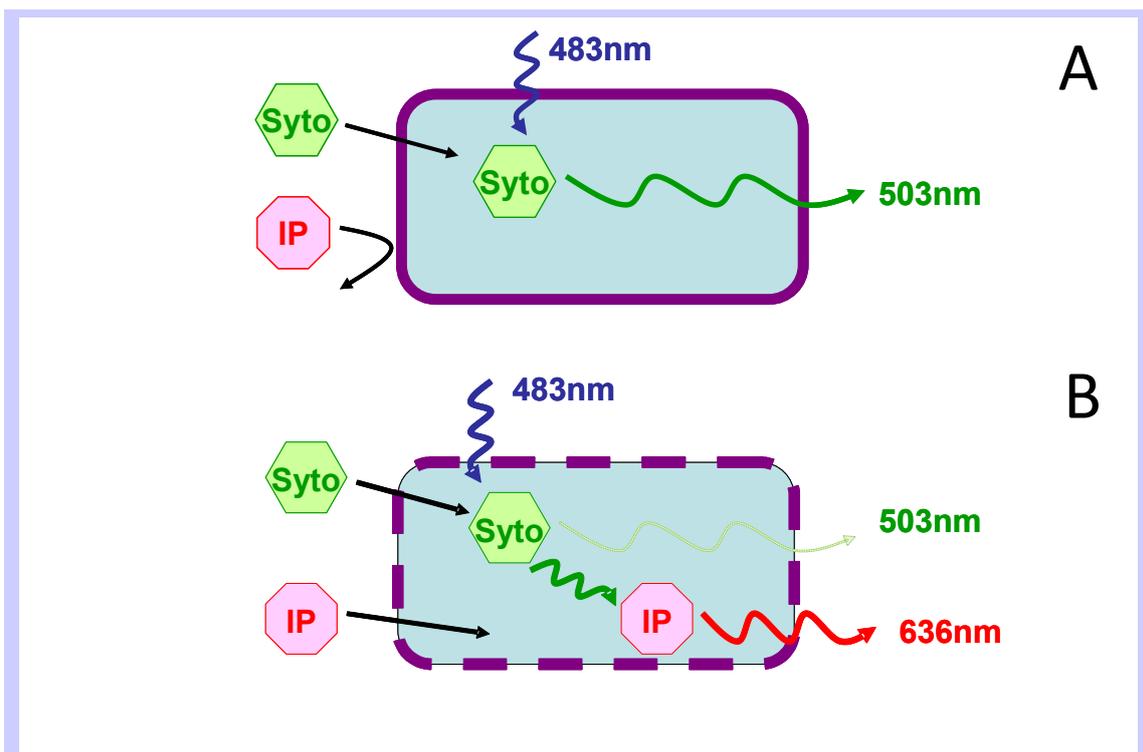
membranas dañadas completamente serán SYTO 9– PI+, en la Figura 2.5 se ilustra el funcionamiento de las sondas.



**Figura 2.4.** Fotografía de los viales conteniendo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 liofilizado en presencia de soluciones 20 % p/v de los azúcares estudiados, se obtuvieron sólidos amorfos.

**Tabla 2.4.** Logaritmos de UFC/mL y permeabilidad al yoduro de propidio (PI) después de la liofilización de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 en presencia de FOS o sacarosa 20 % p/v. Las diferentes letras (a, b, c y d) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Tratamiento	Log UFC/mL	Ingreso de PI (%)
Control sin liofilizar	8.74±0.14 (a)	5.33±1.87 (c)
Liofilizado sin protector	2.79±0.16 (d)	87.62±1.55 (d)
Liofilizado con FOS 2.5 h	8.68±0.00 (a)	23.39±3.54 (a)
Liofilizado con FOS 2.5 h (puro)	6.28±0.10 (b)	17.71±1.34 (b)
Liofilizado con FOS 24 h	8.66±0.10 (a)	21.76±0.27 (a)
Liofilizado con FOS 24 h (puro)	5.76±0.19 (c)	17.14±0.33 (b)
Liofilizado con FOS comerciales	6.40±0.13 (b)	23.49±3.54 (a)
Liofilizado con sacarosa	8.58±0.20 (a)	17.69±0.76 (b)



**Figura 2.5.** Sondas fluorescentes SYTO 9 (hexágono) y ioduro de propidio (PI) (octógono). **A.** El SYTO 9 atraviesa la membrana, difunde pasivamente al interior de las bacterias y se une al ADN dando una fluorescencia verde. **B.** El PI también se une al ADN, dando una fluorescencia roja, pero solo atraviesa la membrana dañada, extinguiendo parcialmente la fluorescencia de SYTO 9. Longitud de onda de excitación: 483 nm, longitud de onda de emisión: 503 nm (SYTO 9) y 636 nm (PI).

La viabilidad de los microorganismos liofilizados en presencia de FOS no purificados o de sacarosa no fue significativamente diferente a la de los microorganismos no tratados ( $p > 0.05$ ). Por el contrario, la viabilidad en los microorganismos liofilizados en presencia de FOS purificados o comerciales fue significativamente menor que la del control sin tratar ( $p < 0.05$ ). Los FOS obtenidos a partir de la síntesis de 24 h y purificados fueron los que menor protección brindaron durante la liofilización. La captación de PI proporcionó información acerca de la integridad de la membrana. Todos los protectores evitaron el daño de esta estructura, pero en diferente medida. Los FOS purificados y la sacarosa fueron los más eficientes. Por el contrario, la eficiencia de los FOS no purificados y de los FOS comerciales fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ).

#### 2.4.4 Estimación del daño global luego de la liofilización

Para estimar el daño global de los microorganismos, las muestras liofilizadas en presencia de los distintos protectores fueron rehidratadas e inoculadas en caldo MRS. Las cinéticas de acidificación

del medio (Figura 2.6) fueron modeladas mediante curvas de descenso de pH en función del tiempo aplicando la ecuación 2.1:

$$pH(t) = \frac{pH_0 - pH_f}{1 + \frac{t}{c}^p} + pH_f \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde  $t$  es el tiempo en horas,  $pH_0$  es el pH al tiempo  $t=0$  h,  $pH_f$  es el pH una vez alcanzada la fase estacionaria,  $c$  es el tiempo en el punto de inflexión y  $p$  el factor de ajuste exponencial.

Para estimar el daño global debido a la liofilización, se determinó el tiempo  $lag$  y la velocidad de acidificación del medio durante la fase exponencial para cada condición. El tiempo  $lag$  se calculó como la intersección entre la recta tangente al punto de inflexión ( $t = c$ ) y  $pH_0$ . La velocidad de acidificación del medio durante la fase exponencial se calculó como el módulo de la pendiente de la recta tangente al punto de inflexión.

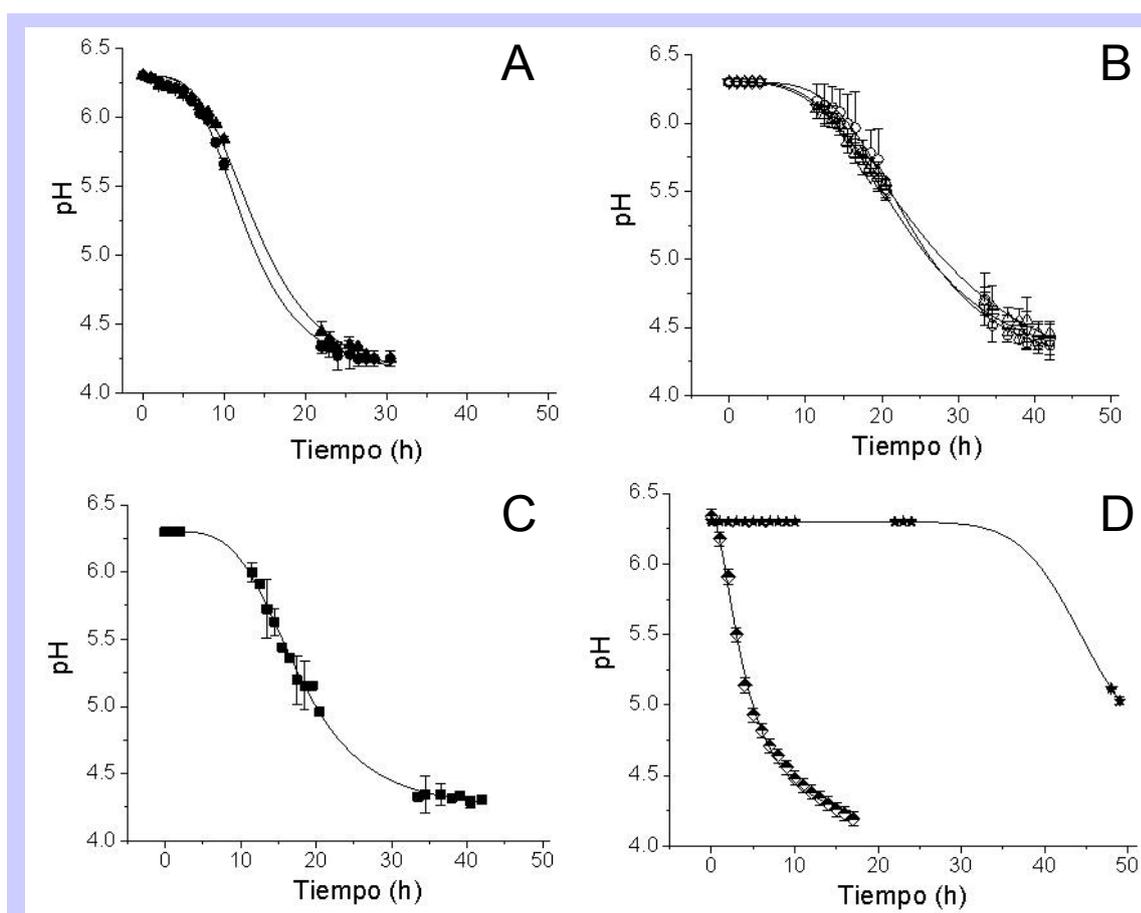
Los parámetros calculados a partir de las cinéticas y las curvas de acidificación se muestran en la Tabla 2.5 y la Figura 2.6.

**Tabla 2.5.** Parámetros cinéticos de acidificación del medio de cultivo para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 luego de la deshidratación por liofilización en presencia de FOS o sacarosa.

FOS/sacarosa	tiempo $lag$ (h)	Velocidad de acidificación del medio (unidades pH/h)	pH (final)	R <sup>2</sup>
2.5 h	5.6	0.15	4.11	0.999
2.5 h (puro)	8.9	0.07	4.02	0.999
24 h	6.0	0.14	4.07	0.997
24 h (puro)	12.6	0.09	4.20	0.997
comercial	10.2	0.08	4.17	0.999
sacarosa	8.5	0.12	4.22	0.997
sin protector	37.1	0.11	4.56	1
control sin liofilizar	0.44	0.25	4.07	0.996

Los microorganismos liofilizados en presencia de los FOS no purificados (síntesis de 2.5 y 24 h) mostraron tiempos  $lag$  cortos (5.6 y 6.0 h, respectivamente) (triángulos hacia arriba llenos y círculos llenos en la Figura 2.6A). Estos valores fueron inferiores al tiempo  $lag$  obtenido para los

microorganismos liofilizados en presencia de sacarosa (8.5 h) (cuadrados llenos en la Figura 2.6C). Las bacterias liofilizadas en presencia de FOS purificados mostraron mayores tiempos *lag*: 8.9 h para los microorganismos deshidratados con FOS obtenidos después de 2.5 h de síntesis, y 12.6 h para los microorganismos deshidratados con FOS obtenidos después de 24 h de síntesis (triángulos vacíos y círculos vacíos en la Figura 2.6B). Los microorganismos liofilizados en presencia de FOS comerciales, que contenían cantidades muy bajas de monosacáridos, presentaron tiempos de latencia similares a los obtenidos para los FOS purificados (10.2 h, triángulos hacia abajo vacíos en la Figura 2.6B).



**Figura 2.6.** Cinética de acidificación del medio de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 liofilizado en presencia de: **(A)** FOS obtenidos después de 2.5 h de síntesis (triángulos llenos hacia arriba) y FOS obtenidos después de 24 h de síntesis (círculos llenos). **(B)** , FOS obtenidos después de 2.5h de síntesis purificados (triángulos vacíos hacia arriba), FOS obtenidos después de 24 h de síntesis purificados (círculos vacíos) y FOS comerciales (triángulos vacíos hacia abajo). **(C)** sacarosa (cuadrados llenos). **(D)** Microorganismos liofilizados en ausencia de protector (estrellas llenas) y microorganismos no liofilizados (rombos semivacíos). Las líneas corresponden a las regresiones no lineales realizadas para las cinéticas de acidificación aplicando la ecuación 2.1 y los parámetros obtenidos experimentalmente. Se grafica el valor promedio de dos determinaciones independientes  $\pm$ DS.

Las velocidades de acidificación siguieron el mismo patrón que los tiempos *lag*: los microorganismos liofilizados en presencia de mezclas de FOS no purificados (que contenían

monosacáridos) o de sacarosa mostraron mayores velocidades de acidificación mientras que aquellos liofilizados en presencia de FOS puros o de FOS comerciales presentaron velocidades más bajas. El pH final fue de alrededor de 4.10 a 4.20 en todas las condiciones ensayadas, con excepción de las bacterias liofilizadas sin protección, que no alcanzaron la fase estacionaria después de 50 h de incubación (Figura 2.6D).

#### **2.4.5 Almacenamiento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 liofilizado en presencia de FOS**

Se estudió el efecto de los FOS sintetizados sin purificar y purificados durante el almacenamiento de los microorganismos a diferentes HRs. Las muestras liofilizadas se equilibraron a HRs de 11, 22 y 33 %. La viabilidad de los microorganismos tratados con los diferentes azúcares luego de alcanzado el equilibrio (7 a 10 días) se muestra en la Tabla 2.6.

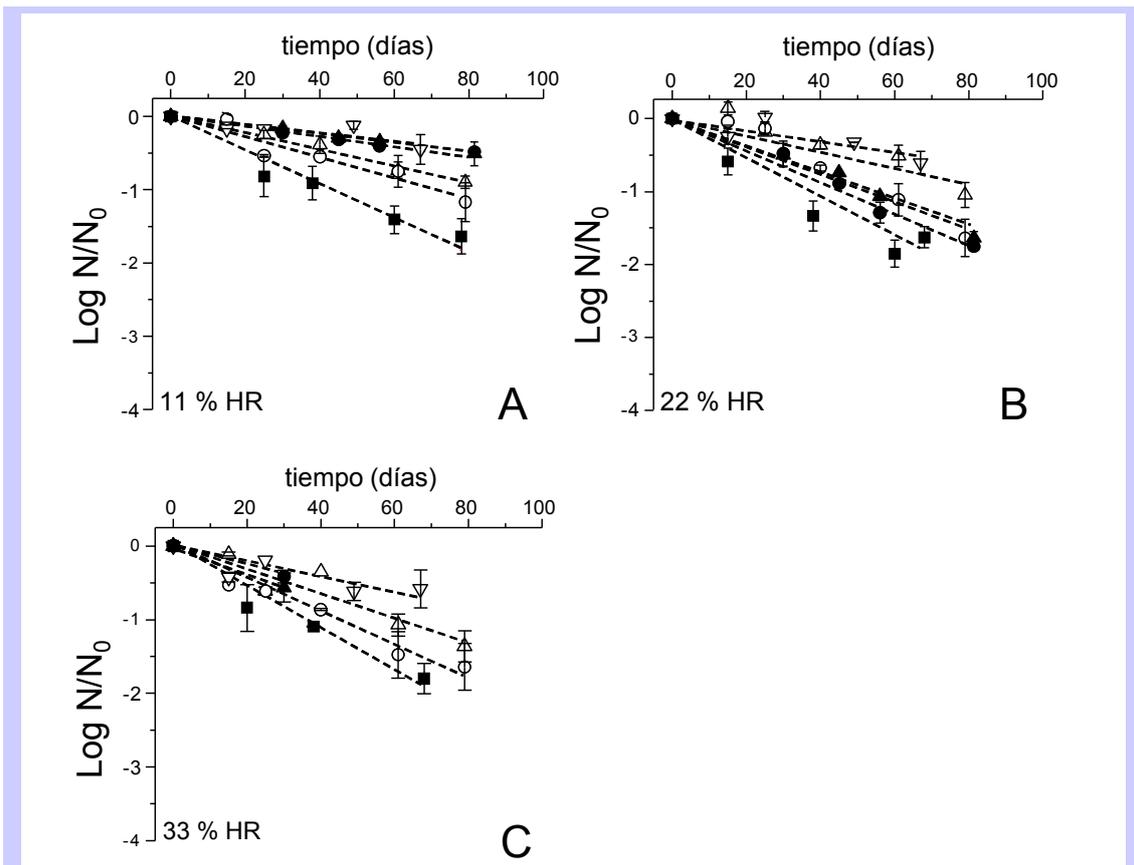
El procedimiento de humidificación produjo una caída de la viabilidad de 1 unidad logarítmica en todas las condiciones (Tabla 2.6).

En la Figura 2.7 se muestra la disminución de la viabilidad ( $\log N/N_0$ ) de los microorganismos equilibrados a 11, 22 y 33 % de HR durante el almacenamiento a 4 °C. Para analizar el efecto de los FOS sólo durante el almacenamiento, se consideró como  $N_0$  (valor inicial de viabilidad) la concentración bacteriana luego de alcanzado el equilibrio con la atmósfera de humedad controlada (Tabla 2.6).

El almacenamiento a 11 % HR fue la mejor condición para todos los protectores (Figura 2.7A). Aunque todos los protectores resultaron eficientes, su composición mostró una fuerte influencia en la estabilización de los microorganismos. Los FOS purificados o los FOS con pequeñas cantidades de monosacáridos (FOS obtenidos después de 2.5 y 24 h purificados de síntesis y FOS comerciales) fueron los que mejor protegieron las bacterias durante el almacenamiento. Por el contrario, los FOS sin purificar (es decir, FOS que contenían monosacáridos) resultaron menos eficientes en la protección de los microorganismos durante el almacenamiento. La sacarosa mostró un comportamiento intermedio (Figura 2.7).

**Tabla 2.6:** Logaritmos de UFC/mL de los microorganismos antes y después de liofilizar en presencia de FOS y después de la humidificación a diferentes HR. Letras diferentes (a, b, c y d) representan diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

Tratamiento	Log UFC/mL
<b>Control (no liofilizados)</b>	8.74 ± 0.14 (a)
<b>Liofilización en ausencia de protector</b>	2.79 ± 0.16 (d)
<b>Liofilización con FOS 2.5 h</b>	8.68 ± 0.00 (a)
Humidificación a 11% HR	7.65 ± 0.04
Humidificación a 22% HR	7.98 ± 0.75
Humidificación a 33% HR	8.10 ± 0.71
<b>Liofilización con FOS 2.5 h (purificado)</b>	6.28 ± 0.10 (b)
Humidificación a 11% HR	5.84 ± 0.00
Humidificación a 22% HR	5.54 ± 0.00
Humidificación a 33% HR	5.67 ± 0.04
<b>Liofilización con FOS 24 h</b>	8.66 ± 0.10 (a)
Humidificación a 11% HR	7.79 ± 0.02
Humidificación a 22% HR	8.27 ± 0.71
Humidificación a 33% HR	7.79 ± 0.02
<b>Liofilización con FOS 24 h (purificado)</b>	5.76 ± 0.19 (c)
Humidificación a 11% HR	4.70 ± 0.07
Humidificación a 22% HR	4.71 ± 0.05
Humidificación a 33% HR	4.98 ± 0.07
<b>Liofilización con FOS comerciales</b>	6.40 ± 0.13 (b)
Humidificación a 11% HR	5.40 ± 0.00
Humidificación a 22% HR	5.07 ± 0.10
Humidificación a 33% HR	5.24 ± 0.28
<b>Liofilización con sacarosa</b>	8.58 ± 0.20 (a)
Humidificación a 11% HR	8.58 ± 0.00
Humidificación a 22% HR	8.14 ± 0.03
Humidificación a 33% HR	8.58 ± 0.05



**Figura 2.7.** Caída de la viabilidad de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 liofilizado en función del tiempo de almacenamiento a 4 °C. Se consideró  $N_0$  al valor de viabilidad luego de alcanzado el equilibrio con la atmósfera de humedad controlada correspondiente (Tabla 2.6). A: bacterias equilibradas a 11% HR; B: bacterias equilibradas a 22 % HR; C: bacterias equilibradas a 33 % HR.  $N$ = UFC/mL de las muestras equilibradas, durante el almacenamiento. Las líneas de punto corresponden a regresiones lineales. Bacterias liofilizadas en presencia de: FOS obtenidos después de 2.5 h de síntesis (triángulos llenos hacia arriba), FOS obtenidos después de 2.5 h de síntesis purificados (triángulos vacíos hacia arriba), FOS obtenidos después de 24 h de síntesis (círculos llenos), FOS obtenidos después de 24 h de síntesis purificados (círculos vacíos), FOS comerciales (triángulos hacia abajo vacíos), sacarosa (cuadrados llenos).

## DISCUSIÓN

Aunque la capacidad protectora de los FOS en los procesos de deshidratación de bacterias puede explicarse en base a su naturaleza química de carbohidratos, su eficacia ha sido demostrada empíricamente, y no se han realizado estudios básicos para analizar el papel de cada oligosacárido en la capacidad protectora de mezclas de FOS. En este capítulo se presentaron distintas condiciones de síntesis para obtener mezclas de FOS de diferente composición y el análisis de la capacidad protectora de dichas mezclas en los procesos de deshidratación de bacterias, comparando su eficacia con protectores tradicionales como la sacarosa. El efecto protector de los FOS fue analizado tanto durante la liofilización como durante el almacenamiento, por lo que el papel de cada oligosacárido presente en las mezclas se pudo interpretar en ambas etapas de conservación.

En el capítulo I de este trabajo de tesis se demostró que la composición de los FOS obtenidos mediante síntesis enzimática puede ser modulada modificando la concentración inicial de sustrato (sacarosa). Aunque DP3 es el oligosacárido producido con la más alta eficiencia independientemente de la concentración inicial de sacarosa. Su contribución relativa en la composición de FOS totales depende de la contribución de otros FOS sintetizados de manera concomitante, como resultado de reacciones enzimáticas acopladas. Como se indicó anteriormente, (Capítulo I sección 1.1.1) la síntesis enzimática de FOS de cadena corta es un proceso complejo que involucra diferentes reacciones de síntesis (transfructosilación) e hidrólisis, que se producen de forma simultánea (en paralelo y en serie) a través de reacciones consecutivas desproporcionadas (Vega & Zuñiga-Hansen, 2014). En estas reacciones, los FOS sintetizados en los primeros pasos actúan como dadores y aceptores de grupos fructosilos que conducen a la producción simultánea de FOS con DP mayor

( $DP_{n+1}$ ) y menor ( $DP_{n-1}$ ) (Jung *et al.*, 1989). Cuando la disponibilidad de sacarosa ( $DP_2$ ) es alta, como ocurre en el inicio de la reacción enzimática, la reacción se desplaza hacia la producción de  $DP_3$  ( $DP_{2+1}$ ), con la liberación de glucosa ( $DP_{2-1}$ ). Una vez alcanzada la conversión máxima de sacarosa,  $DP_3$  actúa como dador y aceptor de un grupo fructosilo para producir  $DP_4$ . Este último actúa como dador y aceptor de un grupo fructosilo para producir  $DP_5$ , sólo cuando  $DP_3$  comienza a disminuir (Vega & Zuñiga-Hansen, 2014). Asimismo, la producción de  $DP_6$  fue posible luego de tiempos prolongados de síntesis (24 h) (Tabla 2.1). Este oligosacárido se produce usualmente partir de la hidrólisis de inulina pero su producción como resultado de la síntesis enzimática de FOS no había sido lograda aún. Sin embargo, es importante tener en cuenta que luego de 24 h de síntesis se observó una disminución de la tasa de transfructosilación/hidrólisis, lo cual se tradujo en un incremento de la concentración de monosacáridos (Tablas 2.1 y 2.2).

En este capítulo se demostró que también se puede modular la composición de las mezclas de FOS deteniendo las reacciones enzimáticas luego de transcurridos diferentes tiempos de incubación. En este sentido, los productos obtenidos después de 2.5 h de síntesis combinaron alta concentración de sacarosa y  $DP_3$  con concentraciones relativamente bajas de  $DP_4$ , mientras que los productos de síntesis obtenidos después de 24 h presentaron una composición más heterogénea, que incluyó  $DP_3$ ,  $DP_4$ ,  $DP_5$  y  $DP_6$ . Debido a las marcadas diferencias en su composición, las mezclas de FOS obtenidas a 2.5 y 24 h de síntesis se seleccionaron para analizar el efecto protector de los FOS y comprender el rol de los diferentes componentes en dicho efecto. Los monosacáridos presentes en ambas mezclas se removieron usando una columna de carbono activado, lo que alteró la composición relativa de las mezclas (dando lugar a los FOS purificados) (Tabla 2.2). De esta manera, se evaluó el efecto de un total de cinco mezclas de FOS de diferente composición: FOS sin purificar y FOS purificados obtenidos luego de 2.5 y 24 h de síntesis, y FOS obtenidos a partir de hidrólisis de inulina (FOS comerciales). Estos últimos presentaron mayores concentraciones de  $DP_6$  y  $DP_7$ , y fueron comparables a los FOS purificados ya que la contribución de monosacáridos era muy baja (Tabla 2.2).

La eliminación de los monosacáridos condujo a aumentos notables en la  $T_g$  de las de las mezclas de FOS (Tabla 2.3 y Figura 2.3). De hecho, las  $T_g$  de los FOS purificados (tanto los obtenidos después de 2.5 como los obtenidos luego de 24 h de síntesis) y las de los comerciales estuvieron entre 6 y 16 °C por encima de la  $T_g$  de la sacarosa (usada como referencia) a las tres HRs ensayadas. En general, las mezclas con oligosacáridos no ramificados de mayor DP presentan mayores  $T_g$  que los mono- y disacáridos, ya que la temperatura de transición vítrea aumenta con el peso molecular y alcanza un valor límite a pesos moleculares moderados. La ecuación de Flory-Fox relaciona la  $T_g$  de los

polisacáridos con el peso molecular promedio ( $M_n$ ) de los mismos, y ha sido para el estudio de efecto del peso molecular de maltodextrinas en la  $T_g$  (Fox *et al.*, 1950):

$$T_g(M_n) \approx T_{g,\infty} - K / M_n$$

donde  $M_n$  es el peso molecular,  $K$ , es una constante,  $T_{g,\infty}$  es el valor límite de la  $T_g$  para el mayor peso molecular.

Considerando que los FOS purificados presentaron principalmente DP3, DP4 y DP5 en su composición, la contribución total de éstos 86 % para ambas mezclas purificadas y 72 % para los FOS comerciales, Tabla 2.2) se puede relacionar con los valores altos de las  $T_g$ s. La presencia de DP6 y DP7 en los FOS comerciales (20 % en total) probablemente contribuya a la elevada  $T_g$  de dicha mezcla (Tabla 2.1). Los FOS sin purificar presentaron valores de  $T_g$  considerablemente menores debido a la presencia de altas concentraciones de monosacáridos (23 y 35% para los FOS obtenidos a partir de 2.5 y 24 h de síntesis, respectivamente) (Roos & Karel, 1991).

La heterogeneidad química de los FOS seleccionados en este estudio nos proporcionó mezclas de oligosacáridos de diferente grado de polimerización combinadas (o no) con monosacáridos. Las diferentes propiedades termofísicas de dichas mezclas nos permitieron contar con un amplio espectro de compuestos para analizar en detalle su efecto tanto en el proceso de liofilización como en el almacenamiento.

La deshidratación involucrada en el proceso de liofilización provoca daños estructurales a diferentes niveles, los cuales pueden ser subestimados si se analiza la eficiencia de los FOS solamente mediante recuentos en placa. Por esta razón, las cinéticas de crecimiento de los microorganismos liofilizados en las diferentes condiciones proporcionaron información acerca de la capacidad bacteriana para reparar los daños y recuperarse después de la liofilización. Dicha capacidad se vio afectada en menor o mayor medida de acuerdo a la composición del protector usado (Figura 2.6). La determinación del tiempo *lag* y la captación de PI aportaron información sobre los daños globales y de membrana, respectivamente (Tablas 2.4 y 2.5). Se observó que los microorganismos liofilizados en presencia de FOS no purificados (obtenidos luego de 2.5 y 24 h de síntesis, y que contenían aproximadamente 44-45 % de monosacáridos y sacarosa) mostraron tiempos *lag* más cortos y mayores velocidades de acidificación (Tabla 2.5), con una mejor capacidad de recuperación que las bacterias liofilizadas en presencia de sacarosa (empleada como referencia). Por el contrario, las bacterias liofilizadas en presencia de FOS purificados o FOS comerciales mostraron tiempos *lag* más largos y menores velocidades de acidificación (Tabla 2.5). Dentro de este grupo, los microorganismos liofilizados en presencia de FOS obtenidos luego de 2.5 h de síntesis y posteriormente purificados presentaron tiempos *lag* más cortos, seguidos por las bacterias

liofilizadas en presencia de FOS comerciales y las liofilizadas en presencia de FOS obtenidos luego de 24 h de síntesis y posteriormente purificados.

Este comportamiento podría estar relacionado con la mayor contribución de FOS de mayor DP en las mezclas. Los FOS purificados obtenidos después de 2.5 h de síntesis estaban compuestos principalmente por DP3 (59 %), y DP4 en menor proporción (24 %) (Tabla 2.2). A su vez, los FOS purificados obtenidos después de 24 h de síntesis y los FOS comerciales tenían 65 y 61 % de DP4+DP5+DP6, respectivamente (Tabla 2.2), con una cantidad considerablemente menor de DP3 (22-25 %, Tabla 2.2). En otras palabras, la mayor contribución de FOS de menor DP ejerció un mayor efecto protector global durante la liofilización. Teniendo en cuenta los resultados de los tiempos *lag* y las tasas de acidificación en su conjunto, es posible concluir que la presencia de monosacáridos en la mezcla de FOS contribuyó a evitar daños globales durante la liofilización. Este efecto protector disminuyó a medida que aumentó la contribución de FOS de mayor DP en las mezclas, a juzgar por la menor capacidad protectora de los FOS purificados, con mayores contribuciones de DP4, DP5 y DP6 (Tabla 2.2).

En cuanto a la captación de PI, aunque todos los protectores resultaron eficientes en la protección de la membrana comparados con los resultados obtenidos para las bacterias liofilizadas en ausencia de ellos, los FOS purificados y la sacarosa resultaron significativamente más eficientes que los FOS no purificados y los comerciales ( $p < 0.05$ ) (Tabla 2.4). La capacidad de la sacarosa para interactuar con las membranas lipídicas sustituyendo moléculas de agua es bien conocida (Crowe *et al.*, 1998). Éste es uno de los mecanismos que explicarían su capacidad de protección durante los procesos de deshidratación (hipótesis de sustitución de agua). Teniendo en cuenta la mayor eficiencia de los FOS purificados para proteger las membranas bacterianas, puede conjeturarse que el mayor contenido de DP3, DP4 y DP5 de los mismos (86-87 %) comparado con el de los FOS sin purificar (53-56 %) permitió una interacción más fuerte con las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana (Crowe *et al.*, 1998). Por el contrario, la presencia de monosacáridos y de FOS de DP mayor que DP5 (como ocurre en los FOS comerciales, donde DP6+DP7 suman 20 %) debilitaría su capacidad para interactuar con dicha estructura. Crowe *et al.* (1998) informaron que la interacción de azúcares con membranas lipídicas [que lleva a una disminución de la temperatura de transición de fase de membrana ( $T_m$ ), y en consecuencia justifica la hipótesis de reemplazo de moléculas de agua] está determinada por su tamaño (Crowe *et al.*, 1998). Así, la rafinosa (DP3) es más eficaz que la trehalosa (DP2) y esta última, más eficaz que la glucosa en la disminución de la  $T_m$  en membranas modelo de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) (Crowe *et al.*, 1998). Hinchá *et al.* (2003) llevaron a cabo un estudio sistemático sobre el efecto de azúcares de la familia de la rafinosa [sacarosa (DP2), rafinosa (DP3), estaquiosa (DP4) y verbascosa (DP5)] en la estabilización de liposomas preparados a

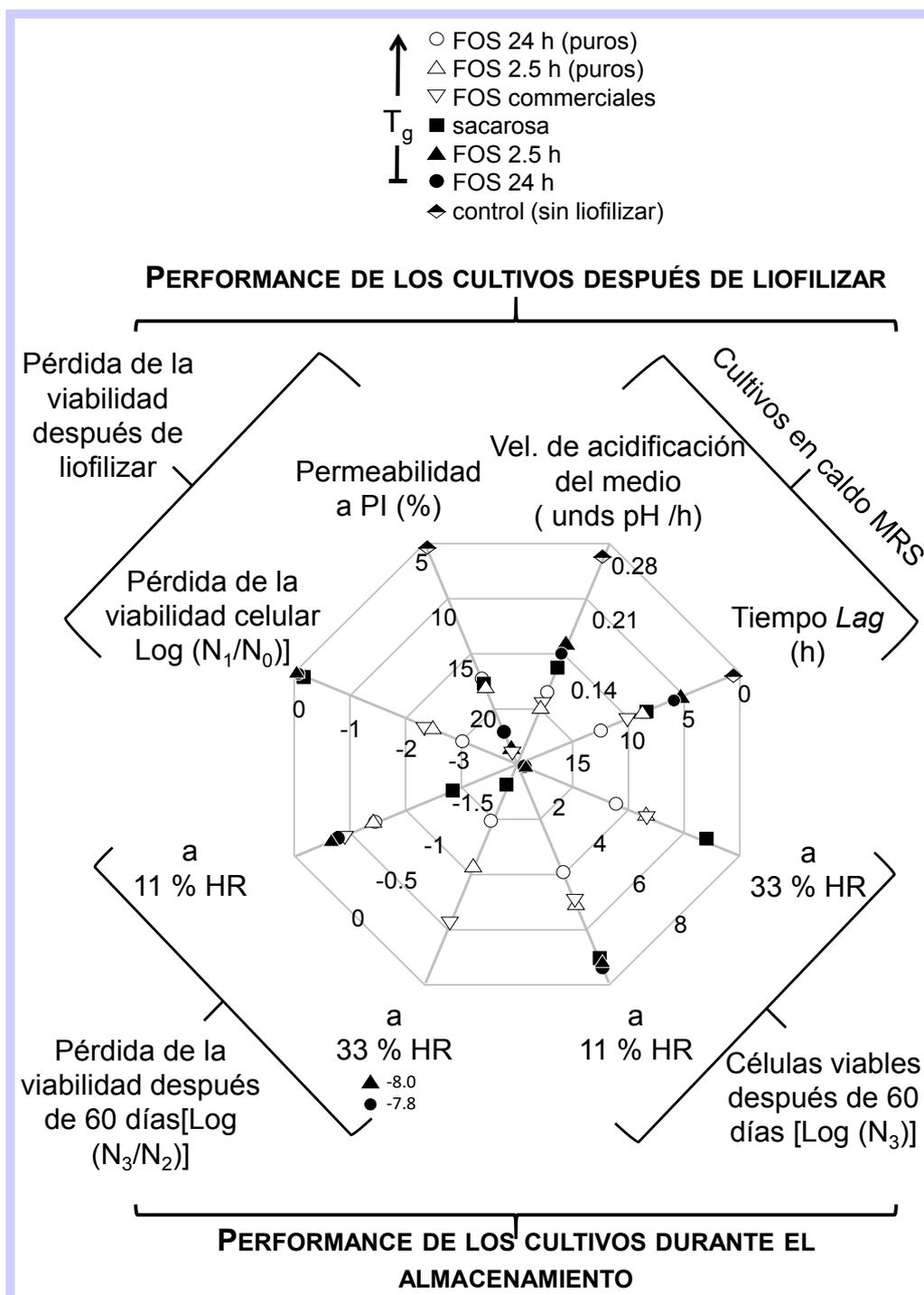
partir de fosfatidilcolina, la cual estuvo directamente relacionado con su DP. Esta estabilización se atribuyó a la mayor capacidad de azúcares con mayores DP para interactuar con las membranas lipídicas, y también a su mayor  $T_g$  (Hincha *et al.*, 2003).

Durante el almacenamiento, las bacterias estabilizadas a 11 % de HR presentaron la mejor *performance* (Figura 2.7A). A dicha HR, no se observaron diferencias significativas en el efecto protector de las cinco mezclas de FOS investigadas. El efecto protector durante el almacenamiento de los FOS purificados y la mezcla comercial puede estar relacionado con sus altas  $T_g$ s (Tabla 2.3). La eficiencia de los FOS no purificados durante el almacenamiento a 11 % de HR puede ser explicada considerando que: a) la temperatura de almacenamiento ( $T_{alm}$ ) (4 °C) estuvo por debajo de su  $T_g$  (Figura 2.3), lo que aseguró que el almacenamiento fuera en estado vítreo (sección 2.4.5); b) la moderada concentración de glucosa en los FOS sin purificar (especialmente en los obtenidos a partir de 2.5 h de síntesis) (Tabla 2.1) puede también contribuir a la protección de las bacterias. La influencia de la vitrificación fue mejor observada cuando las bacterias fueron almacenadas a 22 y 33 % de HR. A 22 % HR, aunque  $T_{alm}$  estuvo por debajo de  $T_g$  (Tabla 2.3, Figura 2.7A y B), los FOS sin purificar evidenciaron una peor *performance* que aquellos purificados (Figura 2.7B). Este comportamiento puede explicarse considerando la menor diferencia en  $|T_{alm} - T_g|$  (parámetro directamente relacionado con la estabilidad durante el almacenamiento) en los FOS sin purificar (Roos & Karel, 1991). Por su parte, las muestras almacenadas a 33 % HR perdieron el estado vítreo ( $T_{alm} > T_g$ ) y se tornaron pegajosas (estado *rubbery*), lo cual impidió la evaluación de su eficiencia (Tabla 2.3, Figuras 2.7C).

En la Figura 2.8 se resumen los parámetros analizados para los protectores investigados en este capítulo, permitiendo observar de manera sencilla la influencia de la composición de los FOS sobre su capacidad protectora. Los parámetros asociados al efecto de los FOS durante la liofilización (tiempo *lag* y acidificación del medio MRS, permeabilidad a PI y pérdida de la viabilidad) se muestran en la parte superior de la figura, y los relacionados al efecto de los FOS durante el almacenamiento (pérdida de la viabilidad después de 60 días de almacenamiento a 11 y 33 % HR y viabilidad remanente luego de dicho tiempo de almacenamiento), en la parte inferior. Los valores representados en cada vértice del octógono representan la mejor *performance* para cada parámetro. Por consiguiente, cuanto más próximo al vértice, mejor *performance*. Aunque los FOS sin purificar mostraron mejor *performance* durante la liofilización y el almacenamiento a 11 % HR, su baja  $T_g$  imposibilitó su uso como matrices vítreas durante el almacenamiento a 33 % HR.

Debido a que la vitrificación es condición necesaria pero no suficiente para una buena protección (Romano *et al.*, 2015), diferentes autores propusieron el uso conjunto de polisacáridos con alta  $T_g$  (*e.g.*, maltodextrina, almidón) con azúcares pequeños que no posean alta  $T_g$  pero que

interaccionen bien con la membrana (*e.g.*, glucosa o sacarosa) como una estrategia adecuada de preservación (Hincha *et al.*, 2007; Oldenhof *et al.*, 2005; Crowe *et al.*, 1998). Por esta razón, se puede concluir que el efecto de los FOS en la protección bacteriana durante la deshidratación resulta del balance entre los monosacáridos, la sacarosa y los FOS de mayor DP en las mezclas: los azúcares pequeños son más eficientes en proteger los lípidos de membrana, y los más grandes favorecen la formación de estructuras vítreas.



**Figura 2.8.** Representación esquemática presentando el efecto de los FOS en cada parámetro evaluado (localizado en cada vértice del octógono). Las escalas son proporcionales a cada eje, cuanto más externo el valor, mejor la *performance*, para la preservación o actividad bacteriana. Los parámetros relacionados con la liofilización se graficaron en la mitad superior de la figura. Estos corresponden a: tiempo lag y velocidad de acidificación en medio MRS, Permeabilidad a PI, pérdida de la viabilidad inmediatamente después de la liofilización. N<sub>1</sub> es la viabilidad después de la liofilización y N<sub>0</sub>, la viabilidad antes del proceso. Los parámetros relacionados al almacenamiento fueron graficados en la mitad inferior del octógono. Estos corresponden a: Pérdida de la viabilidad después de 60 días de almacenamiento a 11 y 33 % HR, y viabilidad remanente después de dicho tiempo de almacenamiento. N<sub>2</sub> es la viabilidad al inicio del almacenamiento (tiempo igual a 0) y N<sub>3</sub>, la viabilidad después de 60 días de almacenamiento. Los símbolos representan liofilización en presencia de: FOS obtenidos a partir de 2.5 h de síntesis, purificados (triángulos vacíos hacia arriba) o no (triángulos llenos hacia abajo); FOS obtenidos a partir de 24 h de síntesis, purificados (círculos vacíos) o no (círculos llenos); FOS comerciales (triángulos vacíos hacia abajo), sacarosa (cuadrados llenos). Cultivos frescos (diamantes semi llenos) fueron usados como control. La flecha cerca de los símbolos indica el aumento de la T<sub>g</sub> para los sacáridos bajo estudio.



## CONCLUSIONES

En este capítulo, se evaluó la capacidad protectora de mezclas de FOS de diferente composición. Los resultados obtenidos mostraron claramente la complementariedad de las dos hipótesis de conservación: los azúcares más pequeños resultaron más eficientes en la protección de las membranas lipídicas, y los de mayor peso molecular presentaron mejores propiedades de vitrificación. De acuerdo a nuestro conocimiento, ésta es la primera vez que se racionaliza el efecto de los componentes de mezclas de FOS sobre la protección de bacterias lácticas deshidratadas.

La modulación de la síntesis enzimática a partir de sacarosa aparece como una alternativa práctica y sustentable para la producción de FOS. Por esta razón, los resultados obtenidos en este capítulo representan un sólido soporte para el diseño de FOS que combinen propiedades prebióticas y mejor capacidad protectora. Asimismo, el estudio termofísico de los FOS a diferentes HRs y su rol durante el almacenamiento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 permite seleccionar las condiciones óptimas de preservación, en vista de su aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales.



## CAPÍTULO III

Secado de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*  
CIDCA 333 en microondas y vacío a escala  
piloto. Efecto de FOS como protectores

## INTRODUCCIÓN

Se estima que el mercado mundial de los cultivos *starters* mueve alrededor de 250 millones de dólares por año (Hansen, 2002), siendo las bacterias lácticas el grupo más importante (Santivarangkna *et al.*, 2007). La gran importancia de este mercado hace necesario contar con métodos adecuados para la preservación de los microorganismos. Entre éstos, la liofilización es el método más empleado en la deshidratación y preservación de microorganismos. La baja temperatura del proceso y el bajo potencial de oxidación lo hacen adecuado para la deshidratación de *starters* (Ahmad *et al.*, 2012). Sin embargo, el proceso de liofilización es largo (48 a 96 h) y requiere la congelación previa de las muestras (en un proceso típico las células son primeramente congeladas a -196 °C en nitrógeno líquido y luego secadas por sublimación bajo alto vacío). Adicionalmente, deben ser considerados el costo de los equipos y los altos requerimientos energéticos, que encarecen el proceso a escala industrial (Ahmad *et al.*, 2012).

En este contexto, se han desarrollado diferentes alternativas de secado para disminuir los costos de preservación. Entre éstas, pueden distinguirse dos grupos principales: a) procesos que se desarrollan a presión atmosférica (ej. secado en *spray*) y b) procesos que se desarrollan por debajo de la presión atmosférica (ej. secado en lecho fluidizado y secado en vacío).

Los mecanismos de inactivación que ocurren en cada caso actúan de modo diferente (Lievens *et al.*, 1994). El secado en *spray* ha sido el más extendido a nivel industrial debido a la rapidez y la capacidad de producción continua, aspecto destacable cuando se necesita procesar grandes cantidades de biomasa (Santivarangkna *et al.*, 2007).

En lo que respecta al secado por lecho fluidizado, se han realizado pocos estudios con bacterias lácticas. El mayor inconveniente es que sólo pueden ser secados materiales granulados, y por lo tanto las células bacterianas deberían ser encapsuladas o atrapadas en un material soporte tal como leche descremada, almidón de papa, alginato o caseína (Santivarangkna *et al.*, 2007).

El secado en vacío es adecuado para el procesamiento de materiales termosensibles, ya que la humedad puede ser removida de los *starters* a baja temperatura. A modo ilustrativo, es importante tener en cuenta que si el punto de ebullición del agua es 100 °C a 100 kPa (1 atm), su equivalente a 1 kPa es 8 °C. Adicionalmente, las reacciones de oxidación pueden minimizarse, lo cual representa una importante ventaja para la deshidratación de microorganismos sensibles.

A pesar de los bajos requerimientos de energía y la eficacia en la recuperación de *starters* deshidratados por este método (comparable con otros procesos de deshidratación) (King & Su, 1993), el secado por vacío no ha sido usado extensivamente, probablemente debido a que éste es regularmente un proceso en *batch*. Asimismo, otra desventaja es el largo tiempo de procesamiento (20 – 100 h) comparado con otros procesos como el secado en *spray* (pocos segundos) o en lecho fluidizado (3 – 4 h). No obstante, estas desventajas pueden ser sorteadas usando un secador con vacío continuo. Hayashi *et al.* (1993) desarrollaron un secador de vacío continuo, en el cual el costo del secado es el 30 % del costo del secado en un liofilizador. Este secador de vacío en continuo es capaz de deshidratar material hasta un 1 a 4 % de humedad (base seca) a 40 °C entre 5 y 10 min. Los productos así deshidratados no son mayormente afectados por la oxidación y muestran buena dispersibilidad (Santivarangkna *et al.*, 2007).

### **3.1.1 El secado por microondas y vacío**

El secado por microondas y vacío representa una solución innovadora para reducir los tiempos de secado requeridos por el secado en vacío. En esta variación, el agua es removida por la combinación del uso de microondas (también llamada “energía radiante” o “radiación no ionizante”) y vacío (Scaman & Durance, 2005).

La energía electromagnética de las microondas penetra la muestra (suspensión de *starters*) y es convertida en energía cinética intermolecular. De esta manera, el calor se genera directamente en el interior de la muestra a secar (Noorbakhsh *et al.*, 2013). Las moléculas que absorben microondas son aquellas cargadas o que tienen enlaces covalentes con momento dipolar distinto de cero ( $\mu \neq 0$ ) como el agua (Durance & Yaghmaee, 2011; Ahmad *et al.*, 2012).

La energía de microondas penetra dentro del material volumétricamente, es decir sobre todo el producto, y es preferentemente absorbida por las partes con mayor humedad. Esto es

especialmente importante en muestras sensibles a la temperatura, las cuales pueden ser deshidratadas adecuadamente, ya que es posible controlar la temperatura predefiniendo la presión de la cámara y la potencia de las microondas.

El secado por microondas y vacío ha sido usado con éxito en diferentes aplicaciones, entre los que pueden mencionarse procesos farmacéuticos, procesamiento de muestras histoquímicas, etc. (Scaman & Durance, 2005). Sin embargo, no ha sido usada extensivamente en la deshidratación de *starters*. En este sentido, Kim *et al.* (1995) estudiaron el efecto de la temperatura y la actividad de agua en los valores de *D* (tiempo de reducción decimal, es decir, el tiempo requerido a una temperatura específica para matar el 90 % de la población bacteriana) en cultivos bacterianos en yogurt secado por microondas y vacío. Dichos autores observaron una mayor supervivencia de los microorganismos deshidratados por microondas y vacío en relación a los secados en *spray* o liofilizados.

Ahmad *et al.* (2007 y 2012) mostraron que la viabilidad de los microorganismos secados en microondas y vacío depende del tipo de protector y su concentración, del tiempo y la temperatura del proceso de secado y del contenido de humedad del material seco al final del proceso. Esto indica que el proceso de secado por microondas y vacío debe ser optimizado para mejorar las condiciones de secado y obtener una mayor viabilidad de los microorganismos.

En resumen, el secado por microondas y vacío constituye un método de gran utilidad para la preservación de *starters* y presenta las siguientes ventajas:

- a) el calentamiento selectivo de las moléculas de agua sin afectar la matriz,
- b) la rápida disipación de la energía a través del material,
- c) una relativa menor migración de compuestos solubles en agua,
- d) menores temperaturas del producto durante el proceso de secado,
- e) un incremento en la velocidad de secado, resultando en una drástica reducción del tiempo de proceso.

Las ventajas mencionadas resultan en un daño mínimo del producto final comparado con otros métodos de secado convencional que conllevan un aumento en la temperatura del producto durante el proceso (Scaman & Durance, 2005; Durance *et al.*, 2006; Ambros *et al.*, 2016). Adicionalmente, la reducción de los costos energéticos de la deshidratación contribuye al uso eficiente de la energía en un modo amigable con el medio ambiente, uno de los principios centrales de la Química Verde.

En base a lo expuesto, en este capítulo se decidió utilizar el secado por vacío y microondas para la preservación a escala piloto de la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 empleando FOS como protectores.



## OBJETIVOS

- Optimizar las condiciones de fermentación a escala piloto de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333
- Estudiar la capacidad protectora de una mezcla comercial de FOS durante la deshidratación de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 en microondas y vacío a escala piloto.

El trabajo experimental se realizó en la Cátedra de Ingeniería de Procesos Alimentarios y Tecnología Láctea (Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie) de la Technische Universität München (Alemania) bajo la dirección del Prof. Dr. Ing. Ulrich Kulozik, en el marco de un proyecto de cooperación internacional entre CONICET y la Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (res. 1962/14).



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.3.1 Microorganismo

Se trabajó con la cepa *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333, aislada previamente en nuestro laboratorio a partir de un *starter* comercial (Gómez-Zavaglia *et al.*, 1999). El cultivo *stock* se preservó en crioviales a -80°C, usándose leche descremada 12 g/L como crioprotector. Los cultivos de trabajo se obtuvieron reactivando la cepa en medio MRS (inóculo del 2 % v/v) a 37 °C en aerobiosis (sin agitación) durante 20h.

### 3.3.2 Optimización de las condiciones de crecimiento y el medio de cultivo

Los ensayos de fermentación se realizaron en un fermentador Biostat C plus (Startorius, Alemania) con un volumen máximo de fermentación de 15 L. El crecimiento del cultivo a lo largo del tiempo se siguió *online* colectando los valores de pH del medio mediante un sensor de pH dentro del fermentador cada 3 min. La temperatura de incubación fue de 37 °C y se ensayó el crecimiento en condiciones estáticas o de agitación mediante paletas a 100 rpm. En ningún caso se administró oxígeno o dióxido de carbono.

Un cultivo en fase exponencial (8 h de incubación) se inoculó en 12 L de medio MRS (de Man *et al.*, 1960), o MRS modificado con lactosa 20 g/L ó 36 g/L (preparado reemplazando la glucosa por

lactosa como fuente de carbono). En todos los casos la densidad óptica ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) inicial del cultivo se ajustó a 0.30. La fermentación se detuvo bajando la temperatura a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.3.3 Obtención de la suspensión de microorganismos

Luego de la fermentación se cosechó el cultivo por centrifugación a  $4000 \text{ g}$  durante  $15 \text{ min}$  a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $12 \text{ L}$  por cultivo,  $2 \text{ L}$  cada vez). El pellet obtenido se lavó tres veces con agua destilada estéril adicionando  $200 \text{ mL}$  por lavado. Finalmente, se lo resuspendió en agua destilada estéril de tal modo que el contenido de materia sólida fuera del  $6 \%$ . La suspensión celular se conservó a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### 3.3.4 Efecto de la concentración de FOS

Para evaluar el efecto de los FOS durante el secado se prepararon muestras a partir de la suspensión concentrada de bacterias ( $25 \text{ g}$  por muestra, contenido  $6 \%$  de materia sólida). Se ensayaron concentraciones crecientes de FOS de  $0, 10, 25, 50, 75$  y  $100 \%$  p/p. La cantidad oligosacáridos adicionados se estableció considerando el contenido de materia sólida de cada suspensión (*e.g.*, para la condición FOS  $10 \%$  p/p, se agregaron  $0.15 \text{ g}$  de FOS a  $25 \text{ g}$  de suspensión celular con un contenido de  $6 \%$  de materia sólida).

Como control se preparó una muestra en *buffer* fosfato salino (PBS;  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $0.15 \text{ mol/L}$  NaCl, pH 7) con un  $6 \%$  de masa sólida sin agregado de FOS.

### 3.3.5 Condiciones de secado

El secado se realizó en un secador de microondas y vacío a escala piloto  $\mu \text{ VAC0150fd}$  Püschner Microwaves (Schwanewede-Bremen, Alemania). Las microondas se administraron por pulsos, de modo tal que la temperatura de la muestra (suspensión de lactobacilos) no superara los  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . La temperatura se monitoreó durante todo el proceso mediante un sensor de infrarrojo (Figura 3.5). Se administró una potencia de microondas de  $1 \text{ W/g}$  de muestra y  $7 \text{ mbar}$  de presión de vacío. El proceso de secado se detuvo cuando la muestra alcanzó un valor de peso constante (aprox.  $2.5$  a  $3 \text{ h}$ ). Las condiciones de secado usadas en este trabajo fueron previamente establecidas por el grupo alemán para la cepa *L. paracasei* F19 (Ambros *et al.*, 2012 y 2013).

### 3.3.6 Actividad de agua ( $a_w$ ; water activity)

Los valores de  $a_w$  se determinaron al finalizar el proceso de deshidratación en el equipo Aqualab 4TEV (Decagon Devices, Inc; Estados Unidos) dotado con sensor por punto de rocío a 25 °C.

### 3.3.7 Determinación del contenido de agua – Titulación de Karl Fischer.

Aproximadamente 100 mg de muestra deshidratada se emplearon para la titulación. Ésta se realizó a  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  con un titulador volumétrico Karl Fischer Titroline 7500 KF (Schott, Alemania), aplicando la técnica de un componente con HYDRANAL-Composite 5 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) y empleando como solvente metanol/formamida (1:1).

### 3.3.8 Viabilidad y daño de membrana

Luego del secado las muestras fueron resuspendidas en agua destilada estéril a 37 °C y mantenidas a esta temperatura durante 5 min en agitación orbital a 100 rpm para facilitar la rehidratación. Sobre las suspensiones rehidratadas se determinó:

#### a) Viabilidad:

Se realizaron diluciones seriadas (factor de dilución: 10). Se sembraron 10  $\mu\text{L}$  de cada dilución en agar MRS por duplicado utilizando el método de la gota (Herigstad *et al.*, 2001). Luego de 72 h de incubación a 37 °C en aerobiosis, se realizó el recuento de viables (UFC/mL de suspensión).

#### b) Integridad de membrana

La integridad de membrana de las células deshidratadas se determinó usando el kit LIVE/DEAD BacLight® (Thermo Fisher, Waltham, MA Estados Unidos) en las condiciones descritas en el capítulo II (sección 2.3.7).

### 2.3.9 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por duplicado. Las diferencias relativas fueron reproducibles independientemente del cultivo utilizado. Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con el programa Infostat v2009 (UNC, Córdoba, Argentina). La comparación de medias se realizó aplicando el test de medias LSD

de Fisher. Para valores de  $p < 0.05$  las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas.



# RESULTADOS

## 3.4.1 Optimización de la fermentación a escala piloto

La alta sensibilidad de la cepa *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 ante cualquier proceso de preservación (Tymczyszyn *et al.*, 2012) la convierte en un modelo adecuado para evaluar el efecto de distintos agentes protectores. Sin embargo, su baja producción de biomasa y su sensibilidad a cambios en las condiciones de crecimiento representan una desventaja al trabajar con esta cepa. Por ello, para maximizar el rendimiento en biomasa, se decidió optimizar las condiciones de fermentación considerando dos aspectos:

- i. Administración de agitación.
- ii. Cambio de la fuente de carbono.

Las fermentaciones se realizaron en un fermentador de acero inoxidable de 15 litros de capacidad (12 L volumen de fermentación) y agitación por paletas (Figura 3.1). La temperatura se mantuvo constante a 37 °C mediante un sistema de refrigeración por camisa y se monitoreó el pH mediante un sensor en el interior del cilindro de fermentación. Los componentes del medio de cultivo fueron adicionados en el fermentador, se ajustó el pH a 6.5 y se esterilizó *in situ* (121 °C, 1 atm de presión, 15 min). La fuente de carbono (glucosa o lactosa) fue esterilizada por separado y agregada inmediatamente antes de iniciar la fermentación. En todos los casos, se empleó como inóculo un cultivo activo en fase exponencial tardía (8 h de incubación). La densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) al inicio de la fermentación se ajustó a 0.30.

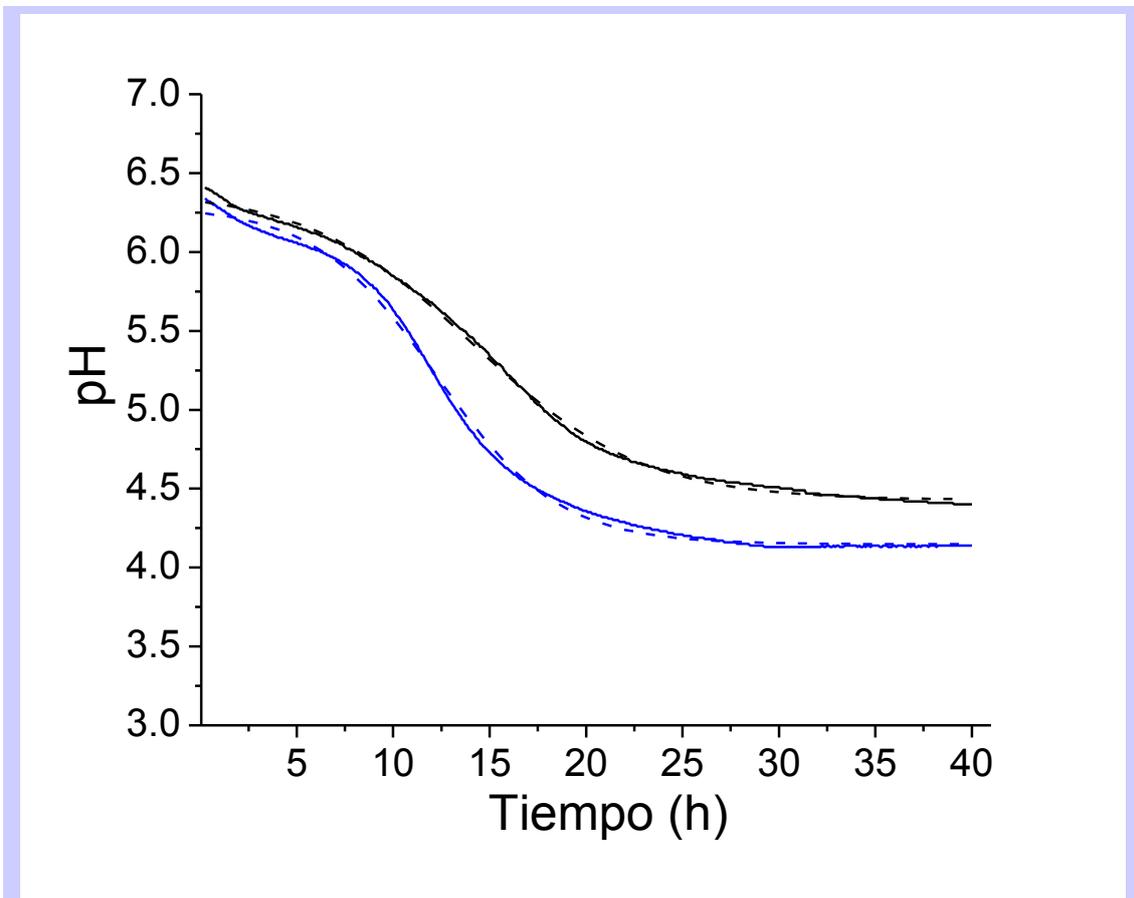


**Figura 3.1.** Fermentador de acero inoxidable Biostat C Plus (Startorius, Alemania) de 15 L de capacidad, control automático de pH, agitación y temperatura.

**i. Administración de agitación:**

Considerando que *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 es anaerobio facultativo (Gómez-Zavaglia *et al.*, 1999), se analizó el efecto de la administración de agitación por paletas a 100 rpm. En la Figura 3.2 se muestran las cinéticas de acidificación en medio MRS en condiciones estáticas (línea

negra) y de agitación (línea azul). El monitoreo de la cinética fue continuo, los valores de pH fueron tomados cada 3 min.



**Figura 3.2.** Cinéticas de acidificación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 en medio MRS. Sin agitación (curva negra continua). Con agitación a 100 rpm (curva azul continua). Las curvas en trazo discontinuo corresponden al ajuste matemático de las cinéticas, realizado para obtener los parámetros de crecimiento. Los valores de pH fueron registrados cada 3 min. Se grafican valores promedio de dos ensayos independientes, DS  $\pm 0.1$  U.A. de pH.

A partir de los valores experimentales de las cinéticas de fermentación y aplicando el ajuste matemático descrito en el capítulo II (Ec. 2.1 página 88) para la cinética de acidificación del medio de cultivo, se obtuvieron los parámetros cinéticos relacionados con el crecimiento en las condiciones ensayadas y se calculó: el tiempo de duración de la fase lag ( $t_{lag}$ ), la velocidad de acidificación del medio ( $r_{am}$ ) y el tiempo al cual se inicia la fase estacionaria ( $t_{est}$ ), Tabla 3.1.

<b>Tabla 3.1.</b> Parámetros cinéticos de fermentación.					
Condición	$t_{lag}$ (h)	$r_{am}$ (U.A. /h)	$t_{est}$ (h)	$pH_f$ (U.A.)	$R^2$
MRS sin agitación	5.57	0.11	22.86	4.33	0.998
MRS agitación 100 rpm	5.89	0.16	18.55	4.24	0.998
$t_{lag}$ : duración de la fase lag		$t_{est}$ : inicio de la fase estacionaria.			
$r_{am}$ : velocidad de acidificación del medio.		$pH_f$ : pH al final de la fermentación			

En ambas condiciones, la duración de la fase *lag* (adaptación al medio), se extendió aproximadamente por 6 horas.

Durante la fase exponencial, el valor obtenido para la velocidad de acidificación del medio fue mayor en condiciones de agitación ( $r_{am} = 0.16 \text{ h}^{-1}$ ), indicando que más células se encontraban metabólicamente activas. Por el contrario, en condiciones estáticas fue menor ( $r_{am} = 0.11 \text{ h}^{-1}$ ), denotando menor actividad metabólica. Esta diferencia en las velocidades de acidificación se reflejó en los valores de  $t_{est}$ , ya que la fermentación en agitación alcanzó más rápido la fase estacionaria ( $t_{est} = 18.55 \text{ h}$ ).

Al final de la fermentación el pH del medio en condiciones estáticas fue ligeramente más alto que en agitación, lo cual es consistente con los valores de los demás parámetros ( $pH_f = 4.33$ ).

Los resultados indican que la administración de agitación suave no afectó negativamente el crecimiento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333, sino que por el contrario, los microorganismos crecieron mejor que en condiciones estáticas. La mayor diferencia en los parámetros analizados fue en  $t_{est}$ , ya que el cultivo en agitación alcanzó la fase estacionaria cuatro horas antes que el incubado en condiciones estáticas.

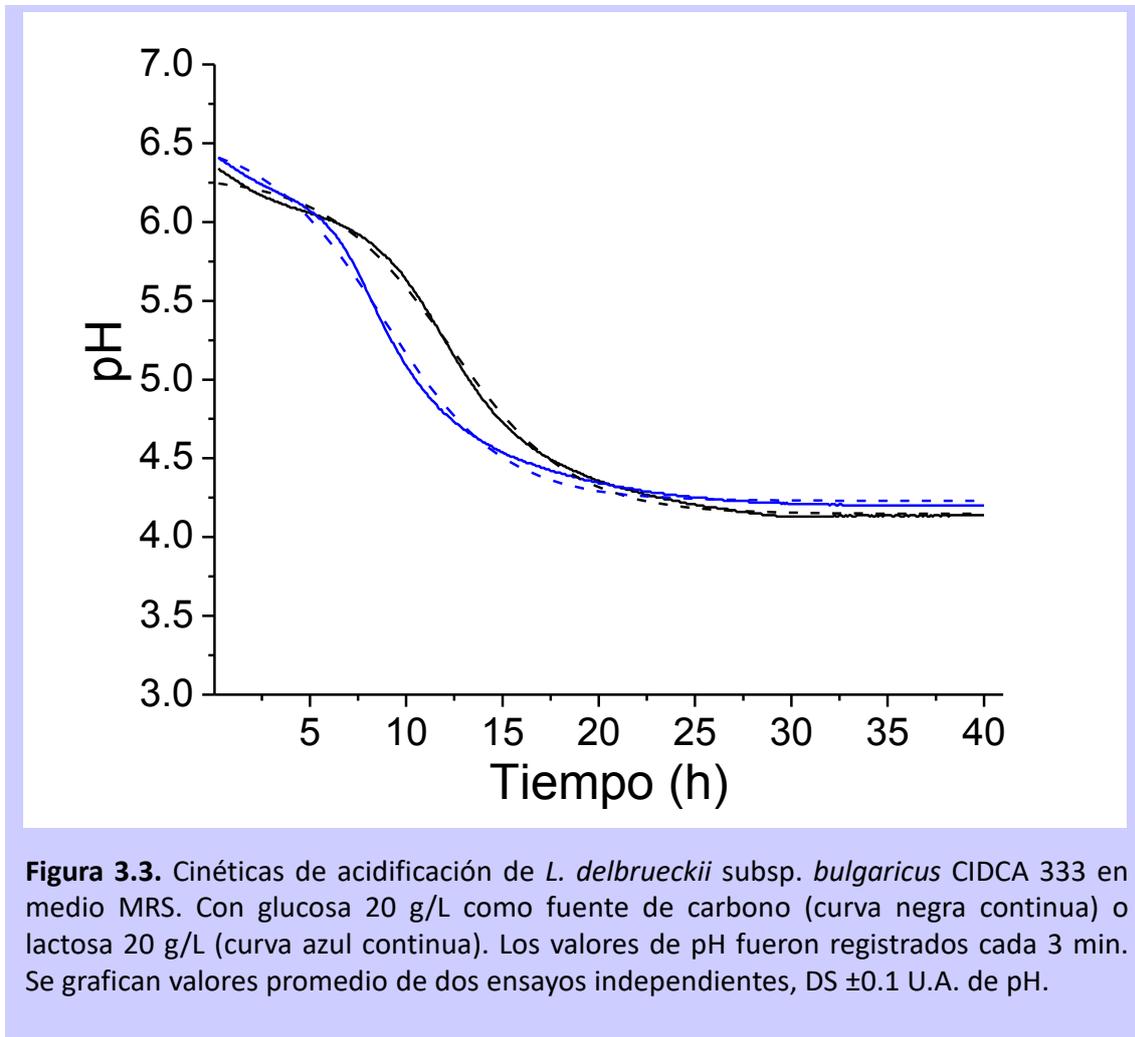
Las diferencias observadas entre las condiciones ensayadas podrían ser atribuidas al volumen de fermentación. En condiciones estáticas, las células se acumulan en el fondo del fermentador sin posibilidad de acceder al medio fresco. Como consecuencia, la cinética se ve retrasada.

En ensayos posteriores las fermentaciones se realizaron en agitación a 100 rpm.

## ii. Cambio de la fuente de carbono

De acuerdo con Chervaux *et al.* (2000), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* muestra una mayor velocidad de crecimiento en medios de cultivo con lactosa en lugar de glucosa como fuente de carbono. Con el objetivo de mejorar el rendimiento en la fermentación, se analizó el efecto del

reemplazo de la fuente de carbono en el medio. En la Figura 3.3, se muestran las cinéticas de acidificación en glucosa 20 g/L (línea negra) o en lactosa 20 g/L (línea azul).

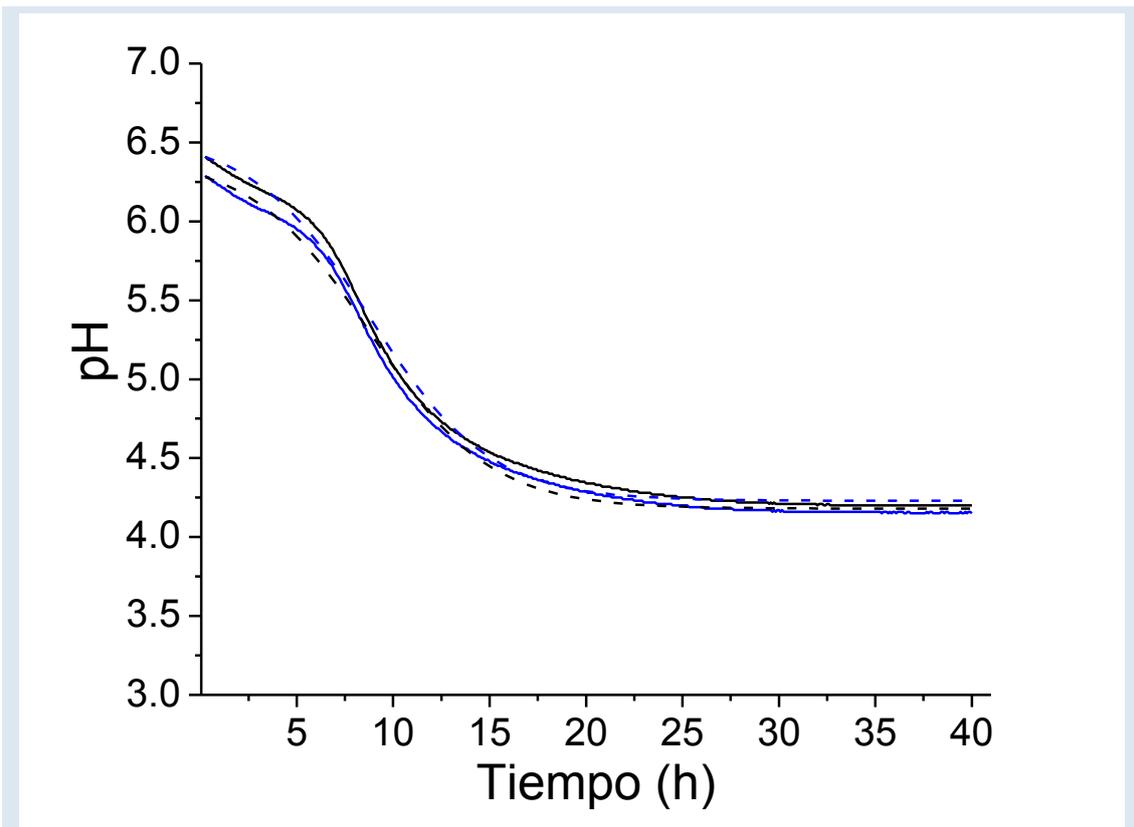


En la Figura 3.4 se muestran las cinéticas correspondientes a las fermentaciones en medio MRS con lactosa en concentraciones de 20 (línea negra) ó 36 g/L (línea azul).

El reemplazo de lactosa por glucosa disminuyó a la mitad la duración de la fase *lag* ( $t_{lag} = 2.59$  h). Por su parte, el aumento en la concentración de lactosa a 36 g/L no produjo cambios significativos en los parámetros de fermentación (Tabla 3.2).

La velocidad de acidificación fue mayor en los medios formulados con lactosa, lo cual era esperable considerando que el metabolismo de este género está mejor adaptado a la lactosa como fuente de carbono (Chervaux *et al.*, 2000).

En cuanto al inicio de la fase estacionaria, el empleo de lactosa disminuyó considerablemente el valor de  $t_{est}$ . En este medio, la fase estacionaria se adelantó 4 horas con respecto al cultivo con glucosa.



**Figura 3.4.** Cinéticas de acidificación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 en medio MRS: suplementado con lactosa 20 g/L (curva negra continua) o lactosa 36 g/L (curva azul continua). Las curvas en trazo discontinuo corresponden a los ajustes matemáticos. Los valores de pH fueron registrados cada 3 min. Se grafican valores promedio de dos ensayos independientes, DS  $\pm 0.1$  U.A. de pH.

<b>Tabla 3.2.</b> Parámetros cinéticos de Fermentación.					
Condición	$t_{lag}$ (h)	$r_{am}$ (U.A./h)	$t_{est}$ (h)	$pH_f$ (U.A)	$R^2$
MRS glucosa 20 g/L	5.89	0.16	18.55	4.24	0.998
MRS lactosa 20 g/L	2.59	0.19	14.99	4.23	0.996
MRS lactosa 36 g/L	2.55	0.18	15.01	4.18	0.997

$t_{lag}$ : duración de la fase lag medio.       $t_{est}$ : Inicio de la fase estacionaria .  
 $r_{am}$ : velocidad de acidificación del       $pH_f$ : pH al final de la fermentación

En la Tabla 3.3 se listan las condiciones seleccionadas a partir de la optimización para la obtención de biomasa del *starter*.

**Tabla 3.3.** Condiciones de crecimiento optimizadas para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 a escala piloto.

Medio de cultivo	MRS lactosa 20 g/L
Agitación	100 rpm
Temperatura de incubación	37°C
Tiempo de incubación	16 h

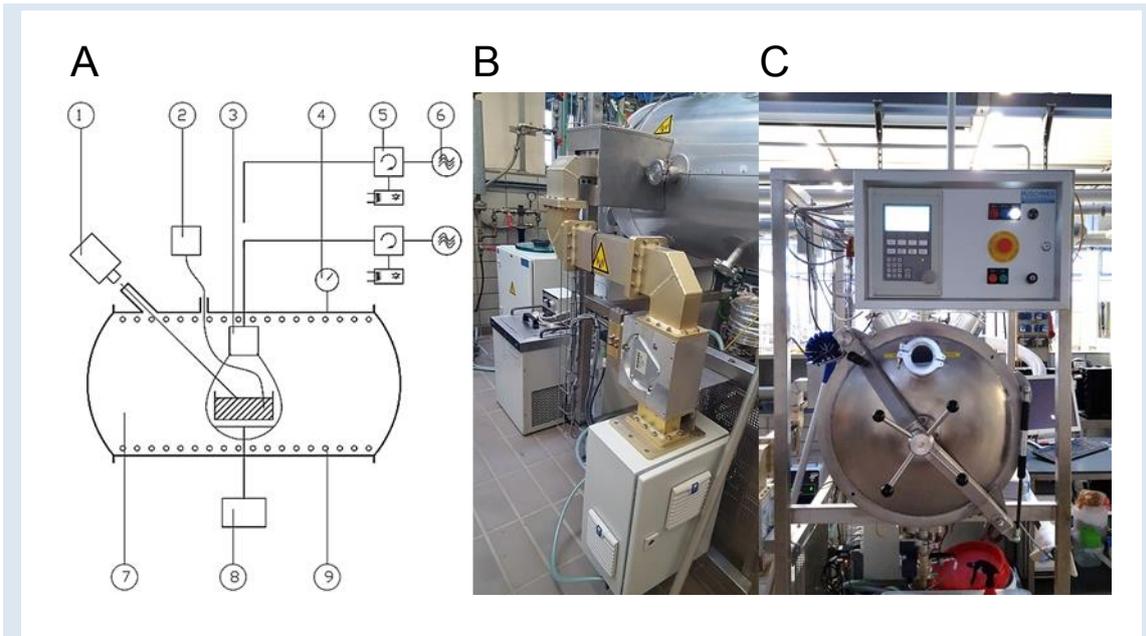
En estas condiciones, a partir de un cultivo de 12 L se obtuvo un rendimiento en gramos de biomasa (materia seca) por litro de medio de cultivo de  $(0.42 \pm 0.14)$  g/L, siendo el número de células viables  $(7.38 \pm 2.09) \times 10^8$  UFC/mL.

### 3.4.2 Secado de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 en vacío asistido por microondas.

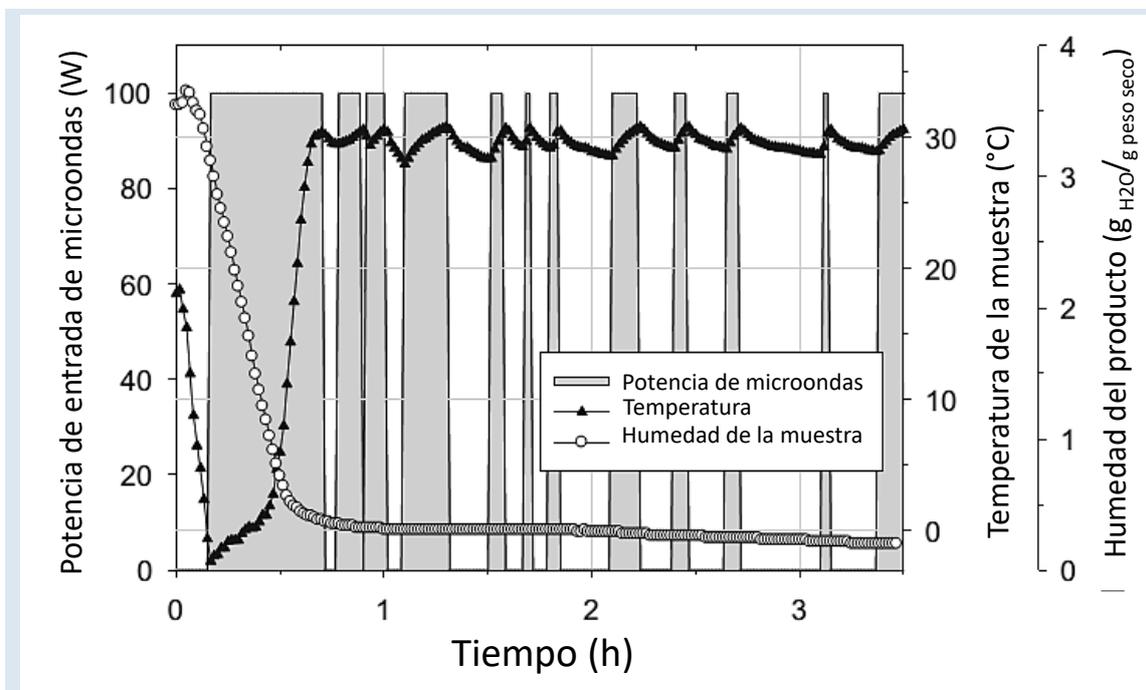
#### 3.4.2.1 Equipo y condiciones de secado

Los ensayos se realizaron en el equipo  $\mu$  VAC0150fd provisto por la empresa Puschner (Schwanewede-Bremen, Alemania) diseñado para operación a escala piloto (Figura 3.5). El proceso se inició descendiendo la presión de la cámara de vacío a 7 mbar. Luego se aplicó energía radiante (microondas) hasta que la muestra alcanzó peso constante. A continuación se describen los aspectos más relevantes:

- I. **Las muestras:** las suspensiones del lactobacilo con o sin el protector fueron fraccionadas en recipientes de vidrio. Cada recipiente contenía 25 g de suspensión y los ensayos se realizaron por duplicado. En cada sesión se secó un total de 100 g de suspensión.
- II. **La energía radiante:** el sistema magnetrón – circulador – antena de microondas administró la energía en pulsos transversalmente sobre la muestra (Figura 3.5 B).
- III. **La temperatura:** la temperatura del producto se controló mediante los sensores de fibra óptica y el sistema de calefacción de pared (Figura 3.5 A), y no superó los 30 °C. En la Figura 3.6 se ilustra el control de la temperatura durante el ciclo de secado.
- IV. **Control del peso de la muestra:** mediante una balanza digital colocada en la base de la bandeja de secado se monitoreó el peso de la muestra a lo largo del proceso (Figura 3.5 B). Una vez que la muestra alcanzó peso constante se terminó el ciclo de secado.



**Figura 3.5.** Secador  $\mu$  VAC0150fd Puschner. **A.** Esquema del secador: (1) Pirómetro, (2) Sensores de fibra óptica para medición de la temperatura, (3) Antena de microondas, (4) Sensor de presión, (5) Circulador, (6) Magnetron (1.2kW/2450MHz), (7) Cámara de vacío, (8) Balanza digital y (9) Calefacción de pared. **B.** Imagen del sistema de generación de microondas (lateral a la cámara de vacío): las microondas se generan en el magnetron (inferior), atraviesan el circulador, y se dirigen hacia la antena de microondas, que las distribuye en la cámara de vacío. **C.** Imagen frontal del equipo de secado: se observa la compuerta de la cámara de vacío, que contiene un revestimiento interno de grafito para evitar el escape de radiación. En la parte superior se ve el tablero de comandos.



**Figura 3.6.** Gráfico de Potencia de microondas de entrada (1 W/g), temperatura y humedad del producto en función del tiempo de secado. Adaptado de Ambros *et al.*, 2016.

### 3.4.2.2 Efecto de la concentración de FOS durante el secado

A partir de una suspensión de lactobacilos (contenido de materia sólida: 6.5 %) se prepararon muestras de 25 g cada una. La masa de FOS adicionada se calculó considerando la masa correspondiente a la materia seca en 25 g de suspensión (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4.** Cantidad de FOS adicionada cada 25 g de muestra.

[FOS] (%p/p)	gFOS/25g <sub>susp</sub>
0	0
25	0.406
50	0.815
75	1.219
100	1.625

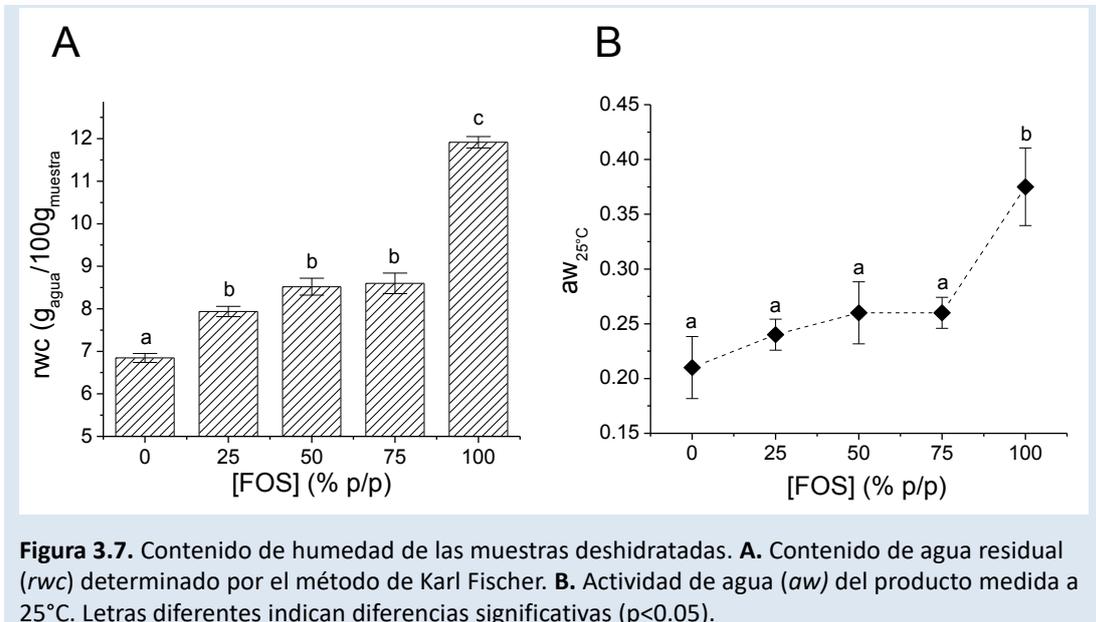
Las muestras fueron deshidratadas de acuerdo a lo descrito previamente. En la Tabla 3.5 y la Figura 3.7 se muestran los valores del contenido residual de agua (*rwc*) y la actividad de agua (*aw*) para las condiciones ensayadas. Los valores corresponden al promedio de datos obtenidos en dos sesiones de secado independientes. En todos los casos, las muestras alcanzaron peso constante a los 90 min de iniciado el proceso.

**Tabla 3.5.** Contenido de agua residual (*rwc*) y *aw* de las muestras deshidratadas en presencia de FOS.

[FOS] (%p/p)	<i>rwc</i> (g/100g <sub>muestra</sub> )	<i>aw</i>
0	6.85 ± 0.10	0.21 ± 0.02
25	7.93 ± 0.12	0.24 ± 0.01
50	8.52 ± 0.19	0.26 ± 0.03
75	8.6 ± 0.24	0.26 ± 0.01
100	11.91 ± 0.13	0.37 ± 0.03

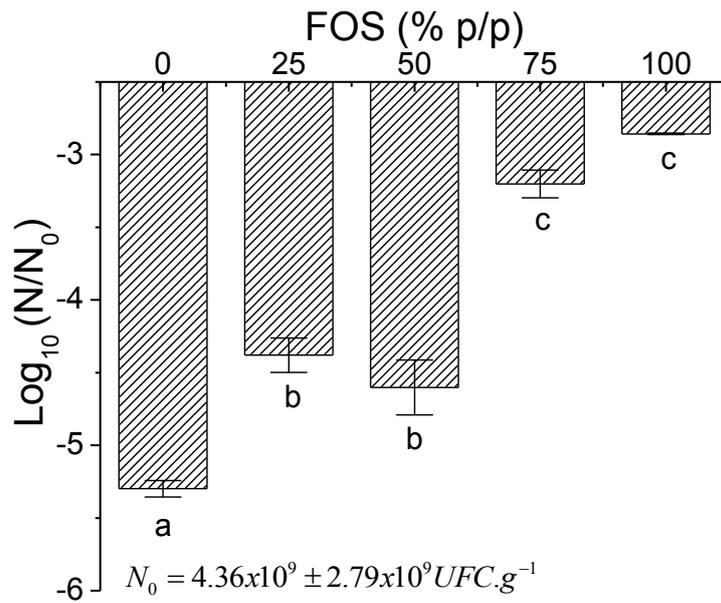
El menor valor de humedad se observó en la muestra deshidratada sin FOS, indicando que los azúcares interfieren en la desorción del agua de la muestra. Por su parte, para concentraciones bajas a medias de FOS, si bien la humedad aumentó significativamente (en promedio, *rwc*: 8.35, *aw*: 0.24), los valores observados fueron consistentes con los informados por otros autores [Kim *et al.*, 1997;

Ahmad et al., 2012; Ambros et al., 2016). Cuando se usó FOS en concentraciones elevadas (100 % p/p) se observó un aumento significativo del *rw*c y *aw* (Figura 3.7A y B), indicando un mayor efecto de los azúcares sobre la desorción del agua.



En lo que respecta a la supervivencia de los lactobacilos, en la Figura 3.8 se muestra la pérdida de la viabilidad, expresada como los valores de logaritmo del cociente del número de UFC luego del secado ( $N$ ) sobre el número de UFC iniciales ( $N_0$ ), en función de la concentración de FOS empleado como protector.

En función de los valores de humedad y *aw* se observan tres grupos. Un primer grupo está integrado por la condición sin protección, donde se observó la mayor caída en la viabilidad (5.35 unidades logarítmicas). Dicho valor es comparable con los valores registrados para la liofilización del *starter* (5.95 unidades logarítmicas, Tabla 2.4 del Capítulo II). Un segundo grupo está integrado por las bacterias secadas con la concentración más alta de FOS (100 % p/p), la cual mostró la menor caída en la viabilidad (2.85 unidades logarítmicas) pero el mayor contenido de humedad. Por ello no puede ser ponderado con los demás. Finalmente, el tercer grupo está integrado por las bacterias secadas con concentraciones intermedias de FOS, que mostraron valores promedio similares de *aw* y humedad. Como se observa en la Figura 3.8, la mayor concentración intermedia (FOS 75 % p/p) mostró la menor caída de la viabilidad (3.20 unidades logarítmicas), diferenciándose significativamente de las concentraciones más bajas (FOS 25 y 50 % p/p) ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3.8.** Decaimiento logarítmico de la viabilidad ( $\text{Log}_{10}N/N_0$ ) en función de la concentración de FOS. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En este sentido, el empleo de FOS comerciales demostró un efecto protector similar al observado durante la liofilización (caída de 2.34 unidades logarítmicas con respecto al cultivo fresco (Tabla 2.4 del Capítulo II). Con respecto al daño de membrana no se observó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la captación de PI, e independientemente de la concentración de FOS empleada el daño promedio fue del  $(25.14 \pm 2.45) \%$ .



# DISCUSIÓN

La producción de *starters* de fermentación resulta de gran importancia para la industria de los alimentos y farmacéutica (Hansen, 2002). Aspectos como el rendimiento en biomasa y los métodos de preservación (*i. e.*, deshidratación, congelación) son relevantes en esta actividad, donde la viabilidad de los microorganismos *starters* se traduce luego en estabilidad durante el almacenamiento y mayor actividad metabólica durante el proceso de fermentación. Asimismo, la optimización de los métodos de preservación permite disminuir los costos de producción, almacenamiento y transporte. En este sentido, la investigación y el desarrollo de nuevas técnicas de preservación resultan de suma importancia en dicha actividad. En este capítulo se buscó analizar el efecto protector de FOS comerciales en la preservación de una cepa modelo, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333, cuya sensibilidad a los procesos de estrés propicia su uso en este estudio. Como método de preservación se escogió el secado por microondas y vacío, una técnica novedosa que combina la energía de las microondas, que penetra la muestra y se convierte en energía cinética intermolecular generando calor directamente en el interior de la muestra y el vacío, un proceso adecuado para el procesamiento de materiales sensibles a la temperatura y a la oxidación (Ambros *et al.*, 2016).

En el capítulo II se estudió el efecto protector de los FOS en la deshidratación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 por liofilización, siendo las mezclas de FOS con monosacáridos las más eficientes en la protección durante el proceso de liofilización, y las mezclas puras más eficientes en la estabilización durante el almacenamiento (Romano *et al.*, 2016). En este sentido, el empleo de FOS comerciales demostró un efecto protector moderado durante la liofilización. No obstante, al igual que los FOS obtenidos por síntesis y luego purificados, los FOS comerciales mostraron un

adecuado efecto estabilizador durante el almacenamiento en un rango de humedades relativas de 0.11 a 0.33 (Figura 2.7). Por tal motivo, para la aplicación a escala piloto descrita en este capítulo se empleó la mezcla comercial considerando el compromiso entre el efecto protector durante el proceso de preservación y el efecto estabilizador durante el almacenamiento, en vista de la aplicación de dichos protectores en la preservación de *starters* a escala industrial.

En primera instancia se trabajó en la puesta punto de las condiciones de fermentación del *starter*. Teniendo en cuenta que las condiciones de crecimiento a escala piloto distan de las empleadas habitualmente en el laboratorio, de la optimización se desprendió que *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 se desarrolló mejor en MRS formulado con lactosa, y que la administración de agitación suave no afectó el crecimiento de la cepa, sino que por el contrario, los microorganismos crecieron mejor que en condiciones estáticas.

En lo que respecta al proceso de secado, la posibilidad del control pulsado de las microondas permitió mantener la temperatura del producto baja, limitando el daño de las células (Figura 3.6). La mezcla comercial de FOS ejerció un efecto protector durante la deshidratación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 y dicho efecto fue dependiente de la concentración (Figura 3.8). En las muestras con concentraciones elevadas de FOS [100 % p/p (con respecto al contenido de masa seca de la muestra)] se observó un mayor contenido de agua residual al final de la deshidratación (Figura 3.7), evidenciando un efecto de los azúcares sobre la desorción del agua durante la deshidratación. En este sentido, Drouzas *et al.* (1999) describieron para la deshidratación en microondas y vacío de geles modelo de pectina, que altas concentraciones de azúcares dificultan el secado secundario de las muestras. Los autores concluyeron que altas concentraciones de azúcares provocaron el colapso de la estructura porosa del gel durante el secado secundario de la muestra, dificultando la desorción del agua. Los valores de viabilidad obtenidos, tanto para el control sin protector como para las muestras deshidratadas en presencia de FOS fueron similares a los observados en el secado mediante liofilización (Capítulo II). Sin embargo, la deshidratación por microondas y vacío demandó menor tiempo de proceso (3 h contra 48 h de la liofilización) y consecuentemente menor gasto energético. En eso radican sus principales ventajas con respecto a la liofilización.

## CONCLUSIONES

En este capítulo se analizó el secado por microondas y vacío para la preservación a escala piloto de la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333. Se estudió el uso de una mezcla comercial de FOS como protectores durante la deshidratación. Considerando que se trabajó a escala piloto, se reformuló el medio de crecimiento y se estudió la administración de agitación suave para optimizar la producción de biomasa.

- *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 se desarrolló mejor en MRS formulado con lactosa en lugar de glucosa y la administración de agitación suave no afectó el crecimiento de la cepa, en estas condiciones la velocidad de acidificación del medio fue mayor.
- La mezcla comercial de FOS ejerció un efecto protector durante la deshidratación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333, dicho efecto fue dependiente de la concentración.
- Altas concentraciones de FOS dificultaron la desorción de agua durante la deshidratación por microondas y vacío.

El secado por microondas y vacío demostró ser una alternativa práctica y eficiente para la deshidratación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333, lo que pone de manifiesto el potencial de esta tecnología en la preservación de *starters* de interés industrial. Adicionalmente, los tiempos cortos de secado contribuyen a la reducción de los costos energéticos de la deshidratación.



## CAPÍTULO IV

Prebióticos como protectores de bacterias  
lácticas inmovilizadas en matrices  
alimenticias no lácteas



## INTRODUCCIÓN

El patrón nutricional de las dietas occidentales, ricas en proteínas, grasas saturadas y carbohidratos refinados, y bajas en fibra, ha sido asociado a una serie de patologías tales como hipertensión, deficiencias de calcio, diabetes, cáncer de colon, cardiopatías, enfermedades inflamatorias del intestino, obesidad y desórdenes hormonales, entre otras. En conjunto, dichas patologías han sido denominadas “enfermedades occidentales” debido a la alta incidencia y mortalidad en el mundo occidental comparada con países de Asia y Europa del este (Adlercreutz *et al.*, 1990).

En la actualidad existe una creciente preocupación en la población por llevar una dieta, la nutrición y un estilo de vida saludables. En respuesta a esta demanda, la industria de los alimentos ha incrementado la oferta de productos saludables y alimentos funcionales, es decir alimentos que proveen beneficios adicionales para la salud más allá de la nutrición básica (Siró *et al.*, 2008).

En este contexto, los alimentos bajos en grasa, de origen orgánico, reducidos en sal, las bebidas sin azúcar, y los alimentos funcionales que incorporan sustancias bioactivas como probióticos, prebióticos, antioxidantes, ácidos grasos omega-3 o vitaminas y minerales, han irrumpido en el mercado ganando popularidad día a día. Se estima que el mercado mundial de alimentos funcionales generará más 130 mil millones de dólares de ganancias en 2016 (Bhadekar & Parhi, 2016). Por otro lado, los factores determinantes para la incorporación de nuevos productos en el mercado son las regulaciones gubernamentales propias de cada país, la confianza de los consumidores en el producto y la conciencia sobre la salud.

En el caso particular de los probióticos, éstos son incorporados principalmente a través de productos lácteos o derivados, tales como yogures, leches fermentadas, leches maternizadas, quesos y postres. Sin embargo, las matrices lácteas presentan algunas limitaciones tales como el alto contenido de colesterol y la presencia de lactosa o proteínas alergénicas de la leche. Al respecto, se estima que más del 75% de la población mundial presenta algún tipo de intolerancia a la lactosa debido a la ausencia de una o más enzimas requeridas para su digestión, siendo este valor cercano al 100% en la población asiática (Petruláková & Valík, 2015).

#### **4.1.1 Matrices alimenticias no lácteas como soporte para probióticos**

La oferta de alimentos funcionales con probióticos en matrices no lácteas es escasa y dominada por productos tradicionales en los cuales los probióticos forman parte del proceso de fermentación (cereales, legumbres) (Blandino *et al.*, 2003). La empresa Attune Foods TM (Estados Unidos) produce y distribuye una barra llamada *Attune Chocolate Probiotic Bar*, que contiene cepas probióticas de *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, e inulina ([www.attunefoods.com](http://www.attunefoods.com)). En cuanto a los suplementos dietarios que contienen probióticos, existen formulaciones probióticas de administración oral, como *Nexabiotic* (Bioprosper Labs, Estados Unidos), que contiene una combinación de 23 cepas probióticas liofilizadas en una concentración de  $3.45 \times 10^{10}$  UFC/dosis (valor correspondiente al total de cepas incluidas), o *Trubiotics* (Bayer, Estados Unidos), constituido por dos cepas probióticas de las especies *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium animalis*.

Los alimentos deshidratados presentan alta aceptación entre los consumidores y bajos costos en la cadena de transporte y almacenamiento (Bhadekar & Parhi, 2016). Debido a su baja actividad acuosa, estos alimentos podrían ser soportes apropiados para la inmovilización de probióticos durante períodos prolongados. En este sentido, el desarrollo de estrategias para la incorporación de probióticos en dichas matrices resulta de suma importancia para la expansión de la industria de alimentos funcionales. Sin embargo, la incorporación de probióticos en alimentos puede verse limitada debido a que los ambientes particulares de cada matriz pueden resultar inadecuados (*e.g.*, bajo pH, baja actividad acuosa, alta la tensión de oxígeno o competencia con otros microorganismos) o las condiciones de elaboración propias del alimento (calor extremo, oxidación, pasteurización y/o condiciones de temperatura y humedad de almacenamiento sub-óptimas (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002). Asimismo, es importante tener en cuenta que algunos componentes constituyentes de la matriz, tales como azúcares, fibra dietaria, proteínas, compuestos fenólicos, etc, pueden tener efectos importantes sobre la viabilidad de los microorganismos presentes en el alimento, actuando

como agentes protectores en algunos casos (Nualkaekul *et al.*, 2012; Saarela *et al.*, 2006) o como agentes perjudiciales en otros (Nualkaekul *et al.*, 2012). En este sentido, harina de avena con 20% de  $\beta$ -glucano demostró proteger a *Lactobacillus rhamnosus* fresco adicionado en jugo de manzana a pH 3.5 y almacenado a 4 y 20 °C, pero no a *Lactobacillus rhamnosus* liofilizado adicionado en el mismo jugo o en cereales de desayuno recubiertos con chocolate. En el último caso, la viabilidad celular sólo mejoró al adicionar dextrinas de trigo y polidextrosa (Saarela *et al.*, 2006). Por su parte, la adición de inulina y goma arábica no ejerció un efecto significativo sobre la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* liofilizado y adicionado a jugos de frutas deshidratados (polvos) almacenados durante 12 meses. Sin embargo, ambos polisacáridos mejoraron la viabilidad bacteriana (con respecto al control sin suplementar) al ser incorporados a un polvo instantáneo obtenido a partir de jugo de arándanos (Nualkaekul *et al.*, 2012).

#### 4.1.2 Prebióticos como protectores de bacterias lácticas en matrices alimentarias

En los últimos años, el interés por la adición de prebióticos y fibras como protectores de probióticos aumentó rápidamente (Burgain *et al.*, 2011). Existe un número creciente de alimentos y bebidas adicionados de probióticos, FOS y otros carbohidratos (mayormente inulina y oligofruktosa) que son incorporados cada año en el mercado de alimentos (de Vrese & Schrezenmeir, 2008). Para evitar la pérdida de viabilidad bacteriana, la encapsulación es el mejor modelo de simbiosis (prebiótico + probiótico). En este proceso se genera un microambiente que protege a los microorganismos luego de la elaboración y almacenamiento del alimento, permitiendo su liberación en el sitio adecuado (*e.g.*, el intestino delgado) (Homayouni *et al.*, 2008; Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2011). Idealmente, la encapsulación de probióticos no debería provocar efectos negativos sobre las características sensoriales del alimento (*e.g.*, provocar aromas o texturas no deseados). Sin embargo, en algunas ocasiones el tamaño de partícula puede afectar negativamente la textura y las propiedades sensoriales del producto (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2011; Mitropoulou *et al.*, 2013). Para evitar estos problemas, un desafío importante en la encapsulación de probióticos es reducir el tamaño de partícula. En este sentido, la microencapsulación confiere una protección similar a la observada en los procesos de secado por *spray*, extrusión, o emulsiones de probióticos (Ross *et al.*, 2005), permitiendo la incorporación de probióticos en alimentos sin alterar su textura (Burgain *et al.*, 2011; Mitropoulou *et al.*, 2013). Sin embargo, mantener la viabilidad celular a lo largo de la vida media del producto constituye un punto fundamental que requiere ser abordado (Weinbreck *et al.*, 2010). Al respecto, diferentes autores informaron que cepas de las especies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Bifidobacterium bifidum*, y

*Bifidobacterium longum* co-encapsuladas con prebióticos tales como inulina (Desai *et al.*, 2004; Capela *et al.*, 2006; Donkor *et al.*, 2007; Paseephol & Sherkat, 2009; Akhiar, 2010; Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014), FOS y oligosacáridos de la familia de la rafinosa (i.e., Raftilose®, Raftiline®) (Anjani *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Iyer & Kailasapathy, 2005; Capela *et al.*, 2006; Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006; Vivek *et al.*, 2013), GOS (Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014), o almidón resistente (Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014) fueron capaces de mantenerse viables durante períodos prolongados en yogurt o leches refrigeradas. Actualmente, en Corea y Taiwan se comercializan yogures que contienen probióticos encapsulados (Doctor-Capsule, Bingrae Co., Kyunggi-do, Korea; Kaung-Chuan Inc., Taiwan) (Rokka & Rantamäki, 2010). Recientemente, Angiolillo *et al.* (2014) desarrollaron un queso de la variedad Fior di latte recubierto con una película comestible de alginato de sodio que contenía *Lactobacillus rhamnosus* y FOS. La viabilidad bacteriana en el producto funcional se mantuvo en  $10^7$  UFC/g durante 6.5, 4.5 y 3.3 días de almacenamiento a 4, 9, y 14 °C, respectivamente. Adicionalmente, el recubrimiento demostró una ligera actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas spp* y Enterobacteriaceae lo cual mejora el sabor final del producto y prolonga su vida media (Angiolillo *et al.*, 2014).

La uso de almidón resistente para encapsular cepas de las especies *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium lactis* y su incorporación en un helado generó un producto con una alta viabilidad bacteriana ( $10^8$ - $10^9$  UFC/g) luego de 3 meses de almacenamiento, sin observarse un efecto negativo sobre las propiedades sensoriales (Homayouni *et al.*, 2008). La incorporación de GOS a microcápsulas de alginato aumentó la supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* en jugo de naranja refrigerado y almacenado (4 semanas) (Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014) y la incorporación de FOS en leche de soja estimuló el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus sp* (Yeo & Liong, 2010). Chen & Mustapha (2012) encapsularon *Lactobacillus acidophilus* con  $\kappa$ -carragenano e inulina, obteniendo resultados de viabilidad satisfactorios al cabo de 14 semanas de almacenamiento a 4 °C. En chocolates con leche a los que se les incorporó *Lactobacillus casei* (libre o encapsulado en alginato) e inulina, el recuento del probiótico se mantuvo alrededor de 8.0 unidades logarítmicas por gramo de producto (8.0 log UFC/g) durante 60 días a temperatura de refrigeración, sin observarse alteración de las características sensoriales del chocolate (Mandal *et al.*, 2013).

A pesar de los resultados mencionados, la incorporación de probióticos en matrices alimentarias continúa siendo un desafío que debe ser tenido en cuenta a la hora de formular alimentos funcionales sin alterar sus propiedades sensoriales. Para afrontar este reto, en este capítulo se decidió inmovilizar microorganismos potencialmente probióticos en matrices de metilcelulosa (Parte I), para ser posteriormente incorporados en la formulación de un *snack* de manzana (Parte II).

## CAPÍTULO IV

### PARTE I

Bacterias lácticas inmovilizadas en películas  
de metilcelulosa y FOS

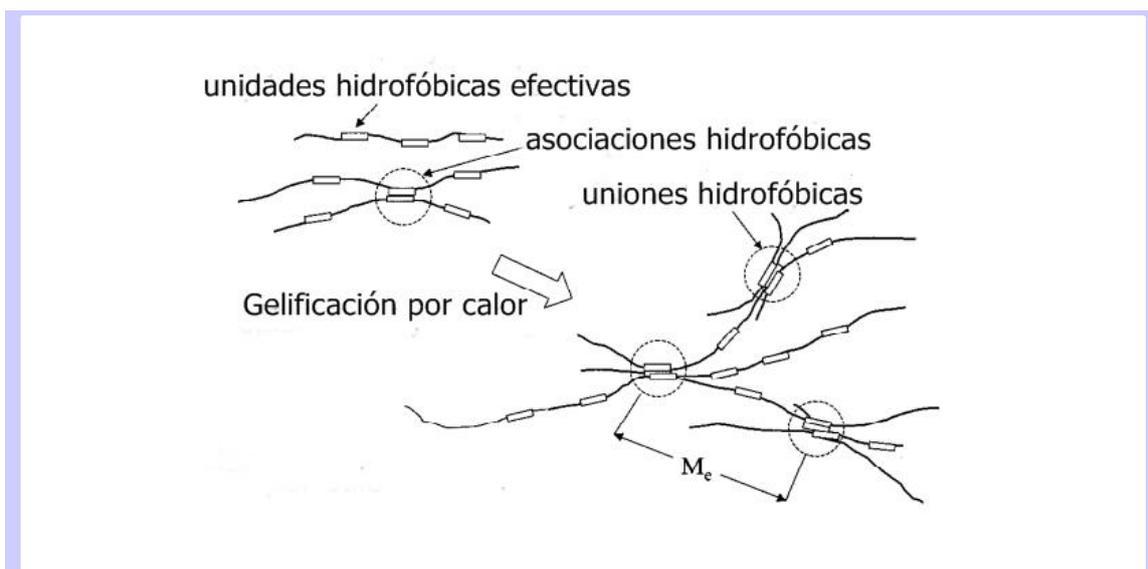
## INTRODUCCIÓN

La incorporación de bacterias lácticas en películas comestibles aparece como una estrategia adecuada para aumentar su resistencia a la deshidratación y almacenamiento en vistas de su aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales. El pequeño volumen ocupado por las películas y su capacidad para inmovilizar cantidades grandes de bacterias permite aumentar la densidad celular, protegiendo los microorganismos durante su transporte, almacenamiento y procesamiento. Todas estas ventajas son especialmente relevantes en el desarrollo de aplicaciones industriales.

Las películas cargadas con bacterias lácticas han sido utilizadas como recubrimientos de alimentos, aprovechando los efectos beneficiosos de los microorganismos y permitiendo así aumentar la vida útil de los diferentes productos (Tapia *et al.*, 2007; Moayednia *et al.*, 2009; Gialamas *et al.*, 2010; López de Lacey *et al.*, 2012). En este sentido, Sánchez-González *et al.*, 2013 desarrollaron películas poliméricas bioactivas como vehículo de bacteriocinas producidas *in situ* por una cepa de *Lactobacillus plantarum*. También ha sido estudiada la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus sakei* inmovilizado en películas de caseinato de sodio (Gialamas *et al.*, 2010). Por su parte, las películas de alginato han demostrado ser vehículos adecuados para la liberación de *L. plantarum*, con buenas perspectivas para aplicaciones farmacéuticas (Brachkova *et al.*, 2009 y 2012; Brachkova *et al.*, 2011).

#### 4.1.1.1 Metilcelulosa como agente gelificante

La metilcelulosa es uno de los derivados de la celulosa más usado en aplicaciones industriales y uno de los más importantes comercialmente (Nasatto *et al.*, 2015). Desde el punto de vista químico, la metilcelulosa es un éter de celulosa soluble en agua. Se trata de un polisacárido lineal formado por unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta(1,4)$ . Se obtiene mediante la sustitución de grupos hidroxilos por metilos ( $-\text{CH}_3$ ) en las posiciones C2, C3 y/o C6 de las unidades de D-glucosa anhidras. Este derivado posee propiedades anfipáticas, tornándose soluble en agua o en solventes orgánicos cuando el grado de sustitución varía de 0 a 3. La metilcelulosa muestra un comportamiento térmico característico, en el cual la viscosidad de la solución acuosa es constante o decrece cuando la temperatura aumenta, siempre y cuando se mantenga por debajo del punto de temperatura crítica ( $29 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). A temperaturas mayores al punto crítico la viscosidad se incrementa fuertemente, dando lugar a la formación de un gel termorreversible (Li *et al.*, 2002). El proceso de gelificación ocurre en dos pasos. En el primer paso se forma un gel débil transparente donde predominan las interacciones hidrofóbicas entre las zonas altamente metiladas de las unidades de D-glucosa (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Esquema del proceso de gelificación a través de las unidades hidrofóbicas efectivas. A bajas temperaturas ( $<60 \text{ }^\circ\text{C}$ ) las asociaciones hidrofóbicas son posibles gracias a las unidades hidrofóbicas efectivas ( $-\text{CH}_3$ ) (gel débil). A temperaturas mayores de  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  se forman uniones a partir de las unidades hidrofóbicas efectivas (gel fuerte).  $M_e$  representa la distancia entre las uniones hidrofóbicas (Li *et al.*, 2001).

El segundo paso ocurre a temperaturas mayores de  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  y se caracteriza por la formación de un gel fuerte opaco con una concomitante separación de fase, la estructura de gel fuerte se debe al crecimiento de las interacciones entre las unidades hidrofóbicas efectivas a lo largo de las cadenas de metilcelulosa, la gelificación se ve influenciada por el patrón de sustitución, la concentración del

polímero y por la adición de ingredientes adicionales como sales, azúcares y alcoholes (Nasatto *et al.*, 2015).

#### 4.1.1.2 Películas comestibles de metilcelulosa como recubrimientos de alimentos

La metilcelulosa es un polímero comestible, de bajo costo, viscoso y de apariencia clara en ambientes acuosos (Li *et al.*, 2002). Sus propiedades únicas como agente formador de películas han dado lugar a varias aplicaciones farmacéuticas y alimentarias (Lin *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2008; Bodvik *et al.*, 2010). Debido al gran número de grupos hidroxilos libres, las películas de metilcelulosa son solubles en agua y resistentes frente a la mayoría de los solventes orgánicos, grasas y aceites (Tavera-Quiroz *et al.*, 2013). Las películas de metilcelulosa pueden hacerse más elásticas y flexibles agregando plastificantes, como sorbitol, glicerol o polioles (Psomiadou *et al.*, 1996; Lucio *et al.*, 2006). Es importante aclarar que el agregado de plastificantes a materiales biodegradables generalmente aumenta la permeabilidad de los mismos y afecta las propiedades mecánicas. Dicho efecto se relaciona con el aumento del volumen libre del polímero debido a las interacciones con el plastificante y la disminución de las interacciones intermoleculares. En consecuencia, la red polimérica se torna menos densa, mejorando así la extensibilidad y la flexibilidad (Liu *et al.*, 2006; Martelli, 2006). Bersaneti *et al.*, (2016) incluyeron FOS en la formulación de películas de almidón de cassava. En este sistema, la adición de FOS disminuyó la  $T_g$  de las películas, siendo los valores obtenidos tanto más bajos cuanto mayor era la concentración de FOS. A partir de dicha información, los autores infirieron que los FOS podrían actuar como plastificantes, interfiriendo en la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares.

El uso de películas de metilcelulosa como recubrimientos activos de alimentos ha sido descrito por varios autores. En la preservación de frutas, Maftoonazad & Ramaswamy (2008) estudiaron las características texturales, el color, la respiración (producción de  $CO_2$ ) y la pérdida de humedad de paltas recubiertas con metilcelulosa durante el almacenamiento a temperatura ambiente. El recubrimiento retardó significativamente los signos de maduración, y la velocidad de respiración se redujo notablemente enlenteciendo las reacciones bioquímicas relacionadas con la senescencia de este fruto (Maftoonazad & Ramaswamy, 2005). Iseppi *et al.* (2008) usaron películas de metilcelulosa cargadas con la enterotoxina 416K1 de *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 como empaquetamiento bioactivo para el recubrimiento de alimentos frescos, demostrando la capacidad de las películas cargadas para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

#### 4.1.1.3 Uso de sustancias protectoras en películas cargadas con probióticos

Teniendo en cuenta que la obtención de películas de metilcelulosa conlleva procesos de calentamiento y deshidratación, aquellas bacterias ácido-lácticas sensibles a estos procesos (*e.g.*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) podrían sufrir daños estructurales, que afecten su recuperación y su capacidad fermentativa. Para evitar estos inconvenientes, la incorporación de compuestos protectores en la formulación aparece como una estrategia adecuada. Diferentes autores han estudiado el efecto protector de los FOS en los últimos años (Schwab *et al.*, 2007; Golowczyc *et al.*, 2011; Chaluvadi *et al.*, 2012), y su rol como protectores bacterianos en procesos que implican deshidratación ha sido descrito en el capítulo II para la liofilización de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333. Teniendo en cuenta las propiedades prebióticas de los FOS, su incorporación en películas de metilcelulosa representaría una doble ventaja debido a su efecto protector y prebiótico (Gibson *et al.*, 2004). Las propiedades estructurales y mecánicas de películas de metilcelulosa han sido estudiadas recientemente (Tavera-Quiroz *et al.*, 2013). Asimismo, han sido desarrolladas películas comestibles a partir de FOS (Ramesh & Siddalingaiya, 2006; Angiolillo *et al.*, 2014; Bersaneti *et al.*, 2016). Sin embargo, la incorporación de FOS en películas de metilcelulosa como protectores de microorganismos sensibles da lugar a nuevos tipos de películas cuyas propiedades físico-químicas deben ser cuidadosamente analizadas. Por otra parte, la inmovilización de microorganismos en películas de metilcelulosa requiere la evaluación adecuada de parámetros como la temperatura y el tiempo de deshidratación, para minimizar las pérdidas de viabilidad. Esto requiere de un estudio exhaustivo del sistema, tanto desde el punto de vista físico-químico como microbiológico.

## OBJETIVOS

El objetivo de las actividades desarrolladas en la presente sección fue el desarrollo de películas de metilcelulosa cargadas con dos cepas de lactobacilos: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 y *L. plantarum* CIDCA 83114, y el uso de FOS como protectores durante la deshidratación bajo convección forzada. Para tal fin se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el efecto de la incorporación de FOS sobre la viabilidad de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 y *L. plantarum* CIDCA 83114 inmovilizados en películas de metilcelulosa.
- Determinar las características mecánicas de las películas obtenidas en presencia de microorganismos y FOS mediante Análisis Mecánico Dinámico (DMA).
- Determinar las características estructurales de las películas preparadas en presencia de microorganismos mediante microscopía SEM y espectroscopia FTIR.
- Determinar las propiedades de permeabilidad al vapor de agua y las isoterms de sorción de agua de las películas de metilcelulosa preparadas en presencia de microorganismos y FOS.
- Analizar la estabilidad de los microorganismos inmovilizados en las películas de metilcelulosa y FOS durante el almacenamiento a 4 °C y a diferentes humedades relativas.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1.3.1 Preparación de las soluciones formadoras de películas

Para preparar la solución de hidrocoloide se dispersaron 1.5 g de metilcelulosa en 50 mL de agua destilada a 80 °C, bajo agitación constante durante 1 hora. Una vez obtenido un sistema homogéneo, se llevó a un volumen total de 100 mL con agua destilada fría, y se continuó agitando a 20 °C. Como plastificante se utilizó sorbitol (concentración final 0.25 % p/v) (Tavera-Quiroz *et al.*, 2013). Luego se adicionó FOS (Orafti Beneo p95, Mannheim, Alemania, 87% de FOS totales, ver Tabla 2.2 Capítulo II) a la solución de hidrocoloide, para obtener concentraciones finales de 0 (control), 1, 2, 3 y 5 % p/v. Las soluciones obtenidas fueron esterilizadas por filtración, usando filtros estériles de 0.2 µm.

### 4.1.3.2 Cepas y condiciones de crecimiento bacteriano

Se utilizaron las cepas *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 y *L. plantarum* CIDCA 83114 previamente aisladas en el grupo de trabajo a partir de leches fermentadas (Gómez-Zavaglia *et al.*, 1999; Garrote *et al.*, 2001). Las cepas se mantuvieron congeladas a -80 °C en leche descremada (120 g/L de sólidos). Los cultivos fueron inoculados en 100 mL de caldo MRS (de Man *et al.*, 1960) a 37 °C (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333) o 30 °C (*L. plantarum* CIDCA 83114) en aerobiosis. Los microorganismos fueron incubados hasta alcanzar la fase estacionaria, cosechados por

centrifugación ( $7000 \times g$  durante 10 minutos) y lavados dos veces con NaCl 0.85 % p/v. En estas condiciones se obtuvo una concentración inicial de microorganismos de aproximadamente  $5 \times 10^8$  UFC/mL para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 (Tymczyszyn *et al.*, 2012) y  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL para *L. plantarum* CIDCA 83114 (Golowczyc *et al.*, 2011).

#### **4.1.3.3 Preparación de las películas cargadas con bacterias**

Los *pellets* bacterianos fueron incorporados en 17-25 mL de solución formadora de película para obtener  $1.1 \times 10^{10}$  UFC/mL de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 y  $2.7 \times 10^{12}$  UFC/mL de *L. plantarum* CIDCA 83114. Luego se extendió una alícuota de 1.5 mL de la suspensión resultante sobre placas de Petri (60×15 mm) y se secó en una estufa de convección forzada a 40 °C durante 2.5 h. Las películas obtenidas (superficie: 28.3 cm<sup>2</sup> y peso: 50 mg) fueron retiradas de las placas y se les determinó el espesor usando un medidor de espesor (Marque Línea DCN-900, Nueva York, Estados Unidos) para materiales no conductores sobre sustratos no ferrosos.

#### **4.1.3.4 Recuento bacteriano en medio sólido**

Se tomaron 50 mg de las películas cargadas con bacterias, correspondientes a 1.5 mL de la solución formadora, y se las sumergió en 5 mL de NaCl 0.85 % p/v durante 10 min para permitir una rehidratación completa. Las suspensiones obtenidas fueron diluidas en serie, plaqueadas en agar MRS e incubadas a 30 ó 37 °C según se tratara de *L. plantarum* CIDCA 83114 o *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333, respectivamente. Este proceso se repitió toda vez en que se evaluó la viabilidad bacteriana [inmediatamente después del secado y durante el almacenamiento (ver Sección 4.1.3.10)].

#### **4.1.3.5 Microscopía electrónica de barrido**

Las películas cargadas con bacterias fueron congeladas en nitrógeno líquido y fracturadas utilizando una hoja de bisturí frío. Las muestras fueron examinadas con un microscopio electrónico modelo Quanta 200 FEI (Países Bajos). Las muestras fueron colocadas en tacos de bronce utilizando una cinta de doble faz y examinadas sin recubrimiento metálico, a baja presión con un voltaje de aceleración de 12.5 kV.

#### 4.1.3.6 Espectros de FTIR de las películas cargadas con bacterias

Se registraron espectros de FTIR de las películas de metilcelulosa en modo de transmisión, en un espectrómetro Thermo Nicolet iS10 (Thermo Scientific, MA, Estados Unidos). Los espectros fueron obtenidos en el rango de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , promediando 64 escaneos y con una resolución espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.1.3.7 Isotermas de adsorción de agua

Se equilibraron 50 mg de las películas cargadas con bacterias (28.3  $\text{cm}^2$ ) a 4 °C en atmósferas de las siguientes sales saturadas: LiCl,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , NaCl, KCl cuyas humedades relativas (HRs) fueron de 11, 33, 44, 75 y 97 %, respectivamente. El contenido de humedad de las películas se determinó registrando su pérdida de peso después del secado en un horno de vacío a 105 °C hasta peso constante (AOAC 1980). Los resultados de la humedad se expresaron en gramos de agua por 100 g de muestra seca (b.s).

Para el ajuste de los datos de las isotermas, se utilizaron los modelos de GAB (Guggenheim-Anderson-de Boer) e Iglesias-Chirife. Según el modelo de isoterma de GAB, el contenido de humedad en la muestra puede expresarse como:

$$M_w = \frac{m_0 C K_{aw} (1 - K_{aw} + C K_{aw})}{(1 - K_{aw})} \quad (\text{Ec. 4.1})$$

donde  $M_w$  es el contenido de humedad en el equilibrio a una determinada actividad acuosa ( $a_w$ ),  $m_0$  es el valor de monocapa (g agua/g sólido) y  $C$  y  $K_{aw}$  son constantes de GAB (Galdeano *et al.*, 2009).

Según el modelo desarrollado por Iglesias y Chirife (1981), el contenido de humedad en la muestra puede expresarse como:

$$M_w = \frac{A a_w}{(1 - a_w)} + B \quad (\text{Ec.4.2})$$

donde  $M_w$  es el contenido de humedad a una determinada actividad acuosa ( $a_w$ ), y  $A$  y  $B$  son constantes de ajuste. Este modelo fue descrito como adecuado para describir el comportamiento de productos con alto contenido de azúcar. Los valores de las constantes  $m_0$ ,  $C$ ,  $K_{aw}$ ,  $A$  y  $B$  en las Ecuaciones 4.1 y 4. 2 obtenidas experimentalmente se muestran en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1**

Parámetros de las ecuaciones de GAB e Iglesias (Ec. (4.1) y (4.2) en el texto).

*Parámetros del modelo de GAB (Ec. 4.1)*

$m_0$	C	$K_{aw}$	$R^2$
12.56	-56.53	0.908	0.992

*Parámetros de modelo de Iglesias-Chirife (Ec. 4.2)*

A	B	$R^2$
2.17	17.98	0.991

#### 4.1.3.8 Propiedades de barrera al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (WVP, g /Pa s m) de las películas cargadas con bacterias se determinó usando el método E96 modificado (ASTM) (Ver Anexo A.1). Para ello, cada muestra fue sellada sobre una celda de permeabilidad y mantenida en una cámara a 20 °C. Se generó, a través de la película, una fuerza impulsora de 1753.55 Pa correspondiente al gradiente generado por una humedad relativa (HR) de 65% a un lado de la película y dióxido de silicio (SiO<sub>2</sub>), 0% HR, al otro lado. Una vez alcanzado el equilibrio, las celdas fueron pesadas en una balanza analítica (0.0001 g de precisión) (Mettler Toledo, Columbus, Estados Unidos) cada una hora hasta completar 8 h de ensayo.

#### 4.1.3.9 Análisis mecánico dinámico (DMA)

Los ensayos de DMA se realizaron en un equipo de análisis mecánico-dinámico Q800 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) (Ver Anexo A.2), usando una pinza de tensión y un sistema de enfriamiento con N<sub>2</sub>. Se ensayaron muestras de películas con geometría rectangular (30 mm de largo, 6 mm de ancho y espesor entre 40 y 50 μm).

Se realizaron barridos de esfuerzo para definir el rango de comportamiento viscoelástico lineal (Navarro *et al.*, 1999) variando la amplitud de 1 a 50 μm a frecuencia fija (5Hz). Los espectros mecánicos las muestras se determinaron mediante barridos de frecuencia (1, 5, 10 and 15 Hz) a amplitud fija desde -100 a 250 °C ( $\Delta T = 5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ ), con una isoterma de 10 min a -100 °C. Se graficaron las curvas de los módulos de almacenamiento (E') y pérdida (E'') y la  $\tan \delta$  (E''/E') en función de la temperatura usando el programa *Universal Analysis 2000* (New Castle, DE, USA). Las temperaturas de los procesos de relajación se determinaron a través de los picos en las curvas de  $\tan \delta$  (Ver Anexo A.2).

#### **4.1.3.10 Almacenamiento**

Las películas cargadas con bacterias se equilibraron durante 15 días en diferentes HRs (sección 4.1.3.7), y se almacenaron durante 90 días a 4 °C. La viabilidad se determinó cada 15 días, tal como fue descrito en la sección 4.1.3.4.

#### **4.1.3.11 Análisis estadístico**

Los experimentos se realizaron por duplicado. Las diferencias relativas fueron reproducibles independientemente del cultivo utilizado. Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con el programa Infostat v2009 (UNC, Córdoba, Argentina). La comparación de medias se realizó aplicando el test de medias LSD de Fisher. Para valores de  $p < 0.05$  las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas.



## RESULTADOS

### 4.1.4.1 Obtención de películas de metilcelulosa cargadas con bacterias lácticas

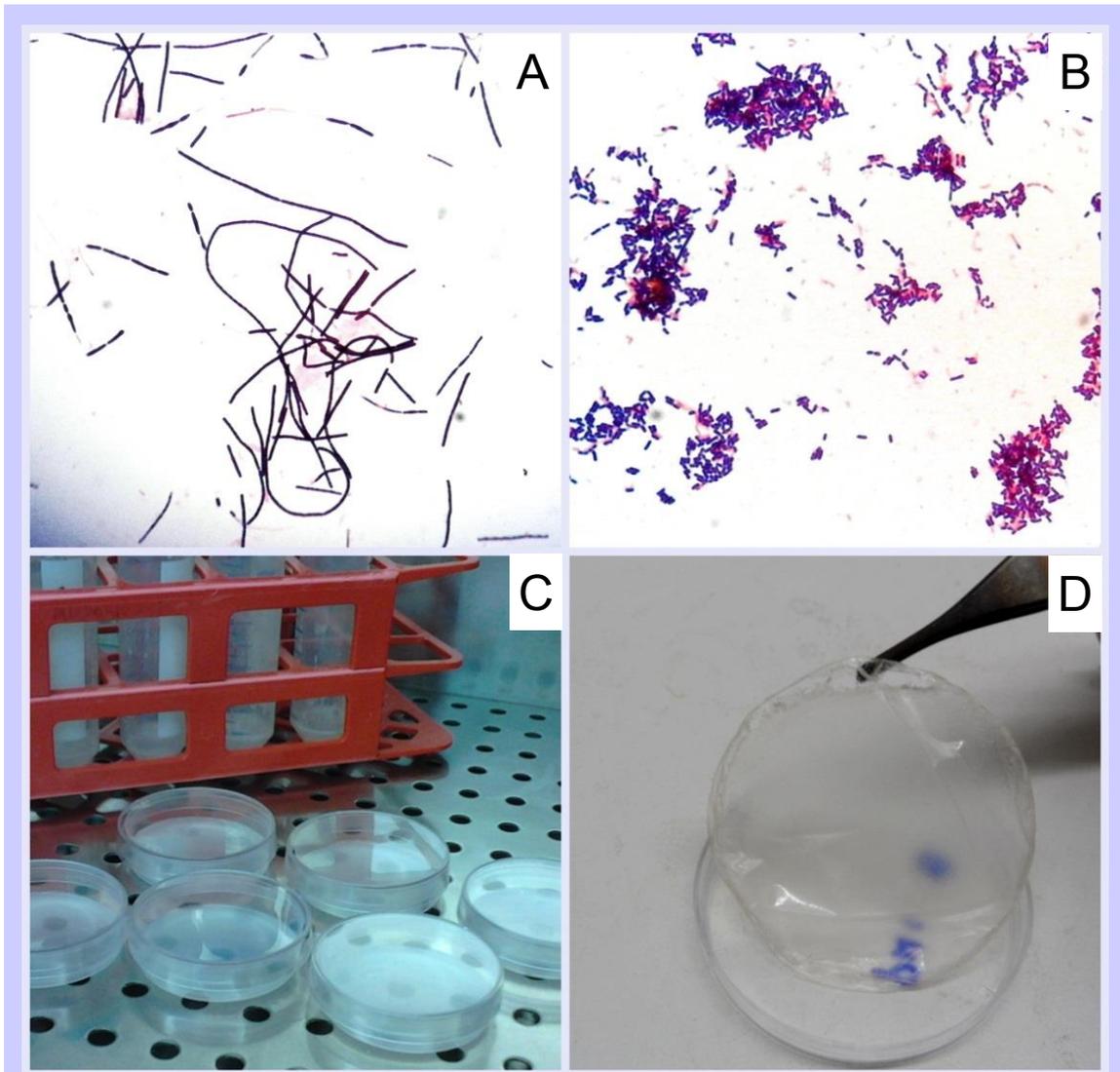
Para la obtención de las películas de metilcelulosa cargadas con bacterias se trabajó con cultivos puros de *L. bulgaricus* subsp. *delbrueckii* CIDCA 333 (Figura 4.2 A) y *L. plantarum* CIDCA 83114 (Figura 4.2 B). *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 fue incluida como cepa testigo para el estudio protector de FOS, teniendo en cuenta su elevada sensibilidad a todos los procesos de preservación (Tymczyszyn *et al.*, 2012. Por su parte, *L. plantarum* CIDCA 83114 fue incluida en el estudio teniendo en cuenta que es una cepa potencialmente probiótica, capaz de inhibir el crecimiento y/o la actividad de *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella* y *Salmonella* (Hugo *et al.*, 2008; Golowczyk *et al.*, 2011; Kakisu *et al.*, 2013 a y b).

Las soluciones filmogénicas de metilcelulosa que contenían los microorganismos y FOS fueron deshidratadas por convección forzada (40 °C, 2.5 h) hasta la obtención de las películas (Figura 4.2D y E).

### 4.1.4.2 Efecto de los FOS como compuestos protectores durante la deshidratación por convección forzada

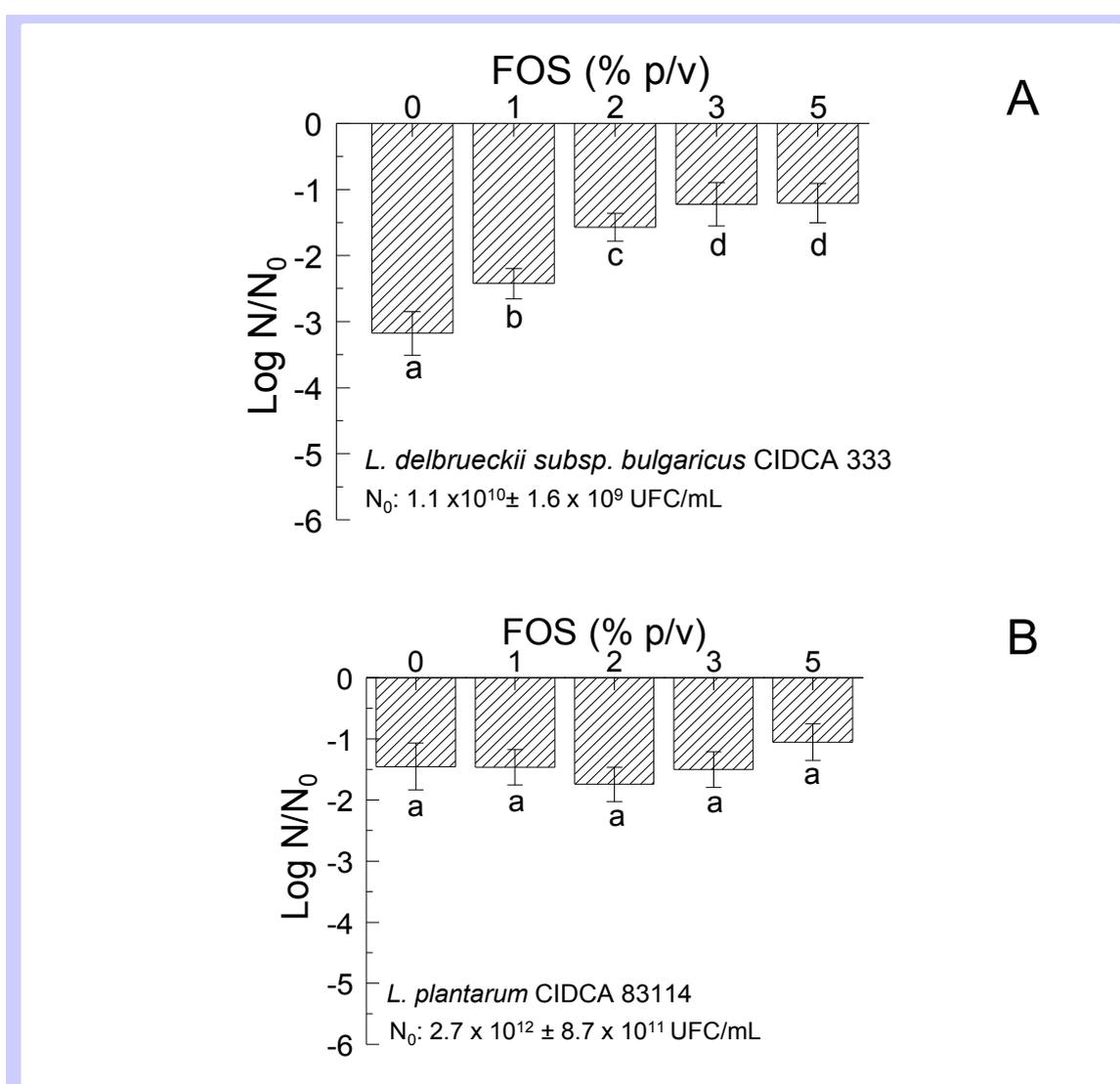
La preparación de películas cargadas con bacterias incluye dos pasos potencialmente perjudiciales para los microorganismos: el efecto osmótico de la solución formadora de películas y el efecto de la deshidratación debido al secado en estufa de convección forzada (40 °C, 2.5 h). En

ambas etapas se analizó el efecto de los FOS sobre la viabilidad bacteriana. De acuerdo a los resultados presentados en el capítulo II, los FOS comerciales (87% FOS), al igual que los FOS obtenidos por síntesis y posterior purificación, demostraron ser eficientes para estabilizar a los microorganismos durante el almacenamiento. Por esta razón, en este capítulo se empleó esta mezcla comercial, en vista de generar sistema potencialmente transferible a la industria de los alimentos funcionales.



**Figura 4.2.** Preparación de películas de metilcelulosa cargadas con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 (A) o *L. plantarum* CIDCA 83114 (B) Tinción de Gram (aumento 1000 x). La solución formadora de película conteniendo los microorganismos se distribuyó en placas de Petri en condiciones de esterilidad (C) y se deshidrató por convección forzada hasta la obtención de las películas (D).

En la formulación de las películas se estudió el efecto de diferentes concentraciones de FOS adicionadas a las soluciones filmogénicas. La concentración de microorganismos en la solución formadora de película no disminuyó significativamente respecto de la concentración de bacterias en el cultivo en la fase estacionaria ( $p > 0.05$ ). No se observaron diferencias significativas en las soluciones preparadas con y sin FOS adicionados. Sin embargo, la deshidratación en estufa de convección forzada dio lugar a una disminución significativa en la viabilidad de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 en ausencia de FOS ( $\log N/N_0 = -3.18 \pm 0.33$ ) (Figura 4.3A). El aumento de la concentración de FOS tuvo un claro efecto protector hasta el 3 % p/v, y no se observó una mejora adicional cuando se adicionaron concentraciones más altas (5 % p/v) (Figura 4.3A).



**Figura 4.3.** LogN/N<sub>0</sub> de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 (A) y *L. plantarum* CIDCA 83114 (B), inmovilizados en películas de metilcelulosa conteniendo diferentes concentraciones de FOS. N<sub>0</sub> corresponde a las UFC/mL en la solución filmogénica (antes del secado). Las letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

*L. plantarum* CIDCA 83114 mostró una resistencia intrínseca mayor al proceso de deshidratación, como lo evidenció la pequeña pérdida de viabilidad en las películas preparadas en ausencia de FOS ( $\log N/N_0 = -1.45 \pm 0.38$ ) (Fig. 4.3B). La adición de FOS hasta una concentración de 5 % p/v no mejoró significativamente la supervivencia de las bacterias durante la formación de las películas ( $p > 0.05$ ) (Figura 4.3B).

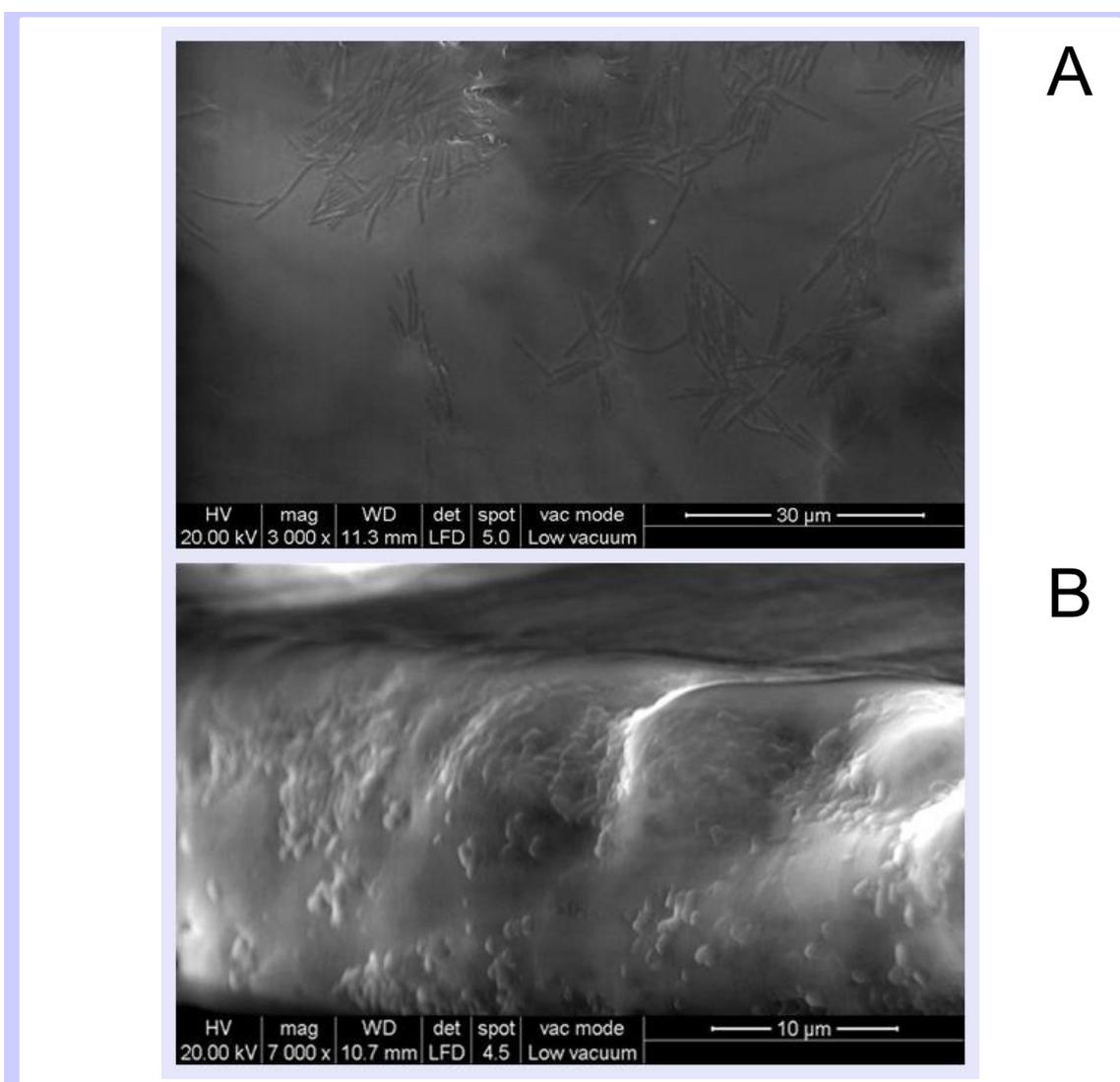
El efecto protector de los azúcares en procesos que involucran deshidratación bacteriana (ej.: liofilización, secado en *spray*, congelación, etc) es bien conocido. En relación a los FOS, en el capítulo 2 mostramos que la capacidad protectora de los FOS durante la liofilización de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 depende del tamaño de los azúcares: los más pequeños resultaron más eficientes en la protección de las membranas lipídicas, y los de mayor peso molecular presentaron mejores propiedades de vitrificación (ver Introducción general, página 13). La interacción de FOS con grupos fosfato disminuye la temperatura de transición de fase ( $T_m$ ) de las membranas lipídicas. Tal como se indicó en el capítulo 2, los azúcares son capaces de establecer puentes de hidrógeno con las cabezas polares de los lípidos de membrana en estado deshidratado, reemplazando moléculas de agua y generando una disminución de la  $T_m$ , lo cual explicaría el efecto protector de los FOS observado en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Se informó que la  $T_m$  de *L. plantarum* deshidratado es de 20 °C (Linders *et al.*, 1997) y la  $T_m$  de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 35-40 °C (Oldenhof *et al.*, 2005). Esto explica la mayor resistencia intrínseca de *L. plantarum* CIDCA 83114 a la deshidratación. Esto es debido a que una membrana con  $T_m$  más baja estará más fácilmente en estado líquido cristalino (que es el deseable para la preservación). De hecho, el mecanismo por el cual los azúcares pequeños protegen, es porque al interactuar con la membrana, disminuyen la  $T_m$  (Sun *et al.*, 1996). Santivarangkna *et al.* (2010) informaron que el sorbitol protege a los lactobacilos durante el secado disminuyendo la  $T_m$  de sus lípidos. El sorbitol es capaz de establecer puentes de hidrógeno con las membranas de las bacterias lácticas a través de los grupos fosfato (Santivarangkna *et al.*, 2010. Sin embargo, La deshidratación en ausencia de FOS en las películas cargadas con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 produjo una caída significativa de la viabilidad ( $p < 0.05$ ) (Figura 4.3 A). Por lo tanto, considerando que al aumentar la concentración de FOS en las películas, se mantuvo la viabilidad luego de la deshidratación, se puede concluir que la presencia de sorbitol, en las concentraciones usadas en este trabajo no ejerció efecto en términos de protección de las bacterias en las condiciones experimentales usadas. Dicha protección obedeció a la presencia de FOS.

#### 4.1.4.3 Análisis estructural de las películas cargadas con bacterias

##### 4.1.4.3.1 Microscopía electrónica de barrido

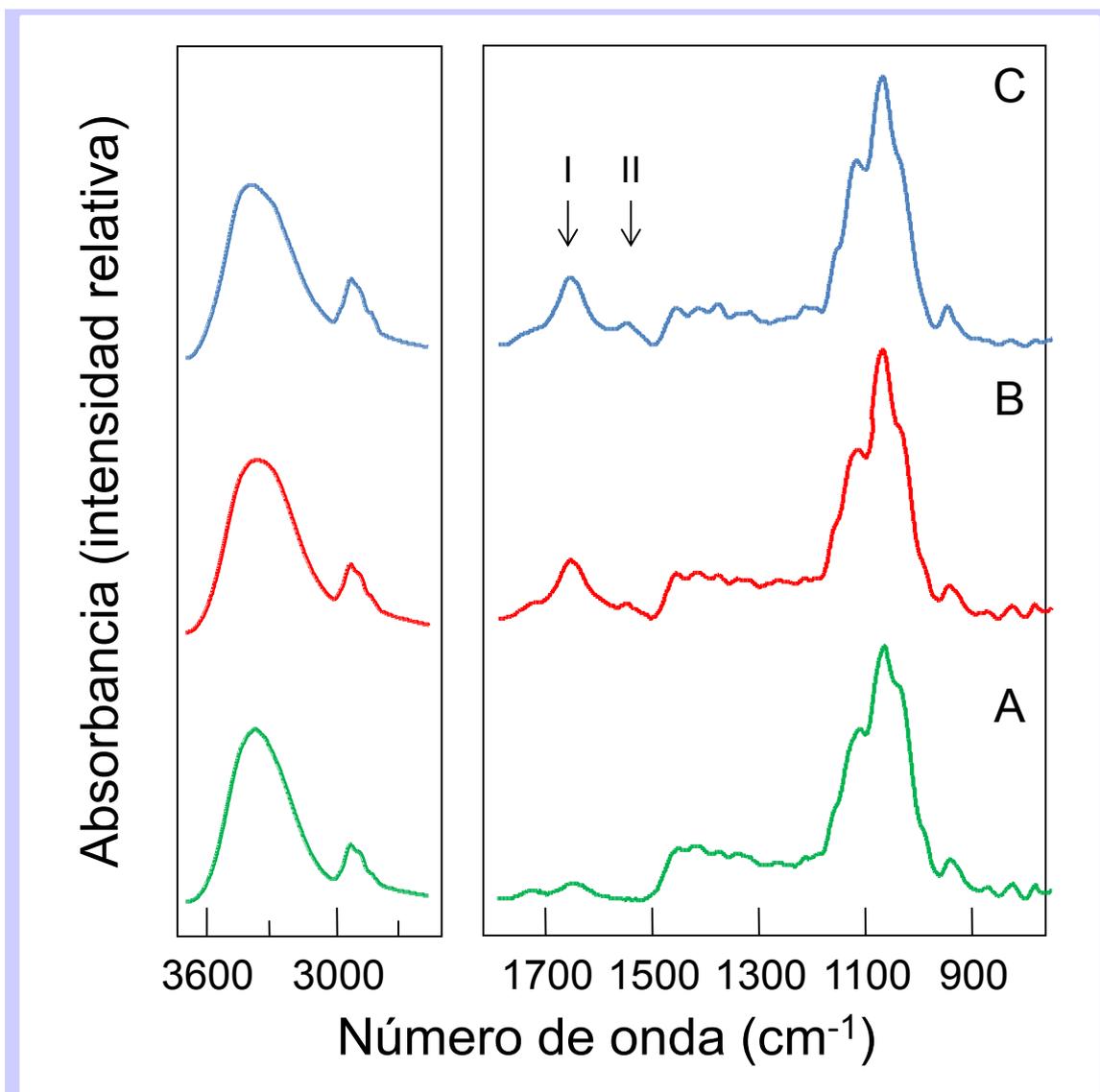
La Figura 4.4 muestra las imágenes de microscopía electrónica de barrido correspondientes a los microorganismos inmovilizados en películas de metilcelulosa conteniendo FOS al 3 % p/v. Ambas cepas bacterianas se ven completamente embebidas en las películas. La homogeneidad de las películas indica su integridad estructural, que no se ve afectada por la presencia de los microorganismos. Por otro lado, la morfología bacteriana no se alteró tras la incorporación en las películas de metilcelulosa.



**Figura 4.4.** Microscopía electrónica de barrido de las películas cargadas con bacterias: **A:** *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333; **B:** *L. plantarum* CIDCA 83114. En las imágenes se indican las barras de escala.

#### 4.1.4.3.2 Espectroscopia FTIR

La Figura 4.5 muestra los espectros de FTIR de las películas de metilcelulosa conteniendo FOS 3 % p/v, cargadas o no con microorganismos (control sin bacterias, películas cargadas con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 y películas cargadas con *L. plantarum* CIDCA 83114). En los tres espectros se observó una banda intensa a  $3380\text{ cm}^{-1}$ . Esta banda se puede atribuir al modo vibracional  $\nu\text{OH}$  de todas las moléculas que contienen grupos OH (metilcelulosa, sorbitol, FOS). Los grupos OH de los polisacáridos de las bacterias también contribuyen a la absorción de esta banda.



**Figura 4.5.** Espectro FTIR de: **A:** películas de metilcelulosa; **B:** con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333; **C:** con *L. plantarum* CIDCA 83114. I y II corresponden a las bandas de amida I y II.

Como todos los espectros se registraron inmediatamente después de la preparación de las películas, la contribución del agua en esta región es escasa. En la región espectral correspondiente a  $1750\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$ , se observaron dos bandas débiles en el espectro de las películas de metilcelulosa

sin bacterias (Figura 4.5 A). Estas bandas se pueden atribuir a pequeñas cantidades de agua atrapadas en la película. En la misma región, las películas cargadas con ambas bacterias mostraron dos bandas intensas, a 1651 y 1547  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a las bandas amida I y II de proteínas (Figura 4.5 B y C), relacionadas con modos vibracionales de los enlaces peptídicos (Gerbino *et al.*, 2011).

En la región 1200-900  $\text{cm}^{-1}$  las películas de metilcelulosa absorbieron fuertemente debido a la contribución de los enlaces glicosídicos C-O-C (en particular los de metilcelulosa y FOS) (Figura 4.5 A) (Kizil *et al.*, 2002). Por otra parte, los enlaces P-O-P de las cadenas de ADN también absorben en esta región (Beekes *et al.*, 2007). Por lo tanto, estos modos vibracionales también contribuyeron las bandas que aparecen en esta región de los espectros IR de las películas cargadas con bacterias (Figura 4.5 B y C).

#### **4.1.4.4 Propiedades físico-químicas de las películas cargadas con bacterias**

Considerando a las películas como matrices transportadoras de microorganismos vivos, sus propiedades físico-químicas deben ser analizadas considerando:

- a) la generación de un ambiente adecuado que asegure la viabilidad bacteriana y
- b) el diseño de películas con propiedades plastificantes adecuadas, que no sean frágiles en las condiciones de almacenamiento.

##### **4.1.4.4.1 Determinación de las isotermas de sorción de agua**

Debido a la naturaleza higroscópica de las películas y al efecto perjudicial que tienen los contenidos elevados de humedad en la preservación de las bacterias, resulta de gran importancia la realización de un análisis profundo de las variaciones del contenido de humedad en las condiciones de procesamiento y almacenamiento. Con este objetivo se realizaron isotermas de sorción de agua. Dichas isotermas permiten prever alteraciones en la estabilidad de materiales biodegradables y determinar la máxima humedad compatible con la viabilidad bacteriana. De esta manera fue posible determinar las condiciones de almacenamiento más adecuadas.

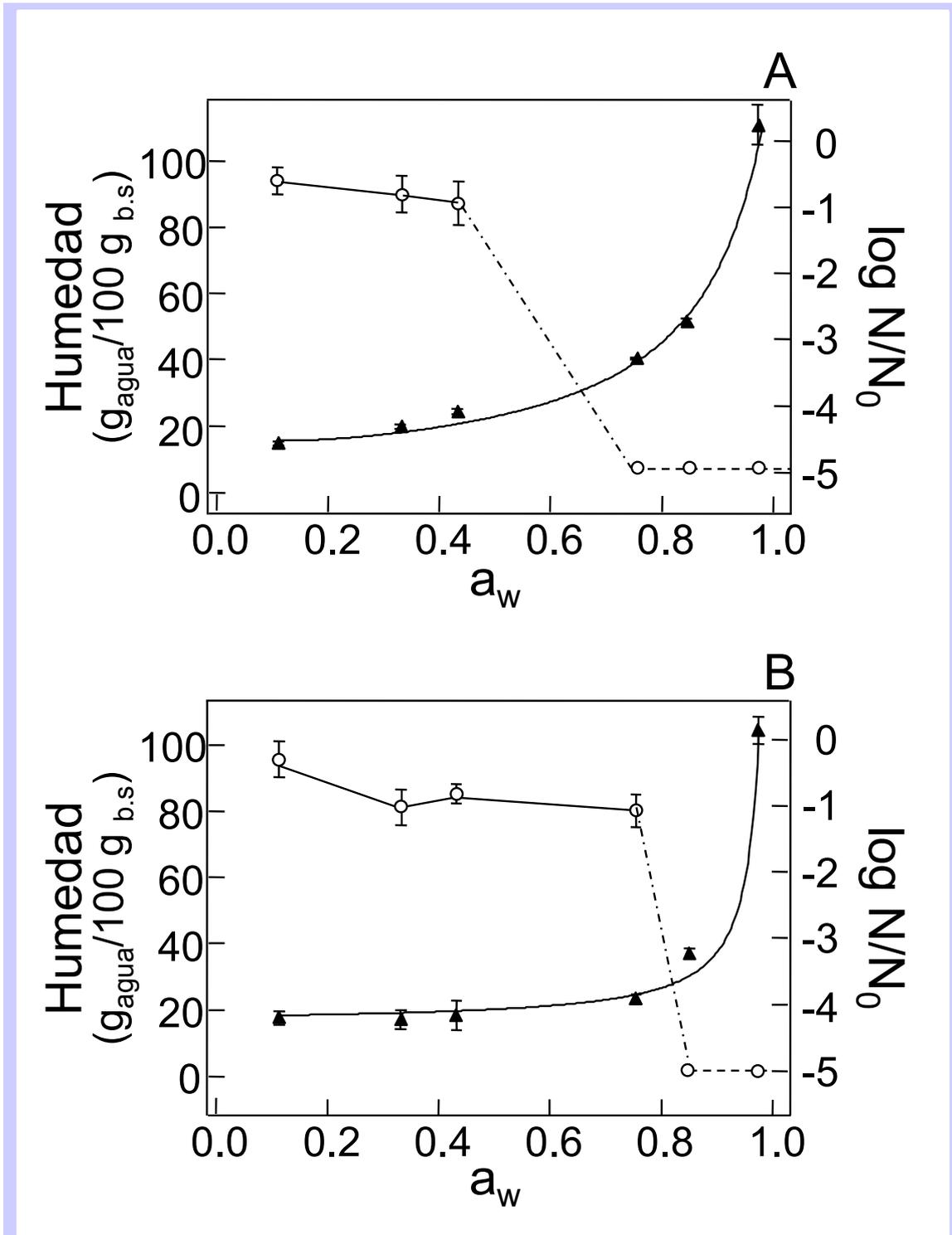
Tanto para las películas conteniendo *L. delbrueckii* CIDCA 333 como para aquellas conteniendo *L. plantarum* CIDCA 83114, la relación entre el contenido de humedad y la actividad de agua (Figura 4.6 A y B) siguió una isoterma de sorción del tipo III (Tipo-J), característica de materiales con alto contenido de azúcar (Falade *et al.*, 2004). Ambas isotermas mostraron un patrón cristalino en el cual a bajas  $a_w$  se observó un comportamiento casi impermeable, y a  $a_w$  superiores a 0.7 se observó la disolución de las películas para formar jarabes. Este tipo de comportamientos es común a algunos

productos con elevado contenido de azúcares, y a componentes poliméricos (Iglesias & Chirife, 1981).

El cambio de estado (de película a jarabe) observado fue concomitante con una drástica caída de la viabilidad bacteriana (Figura 4.6A y B). Este comportamiento confirma los resultados obtenidos en el capítulo II para el efecto protector de los FOS sobre *L. delbrueckii* CIDCA 333, donde se observó una caída de la viabilidad en las muestras liofilizadas en presencia de FOS sin purificar cuando se las almacenó a 33% de HR y 4 °C. La pérdida de la viabilidad se relacionó directamente con la pérdida del estado amorfo de los azúcares en esas condiciones de almacenamiento. Es conocido que en procesos de preservación, la viabilidad es mayor a menores  $a_w$ . En este sentido, ha sido publicado recientemente por nuestro grupo de trabajo que la viabilidad de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 liofilizado en presencia de galacto-oligoacáridos está determinada por la  $a_w$ . De hecho, cuando la  $a_w$  es menor que 0.33 la viabilidad no decrece luego de 45 días de almacenamiento a 4 °C (Tymczyszyn *et al.*, 2012). Además, la baja movilidad molecular también aumenta la estabilidad bacteriana, y esta condición se logra a  $a_w$  bajas y bajas temperaturas de almacenamiento (Tymczyszyn *et al.*, 2012).

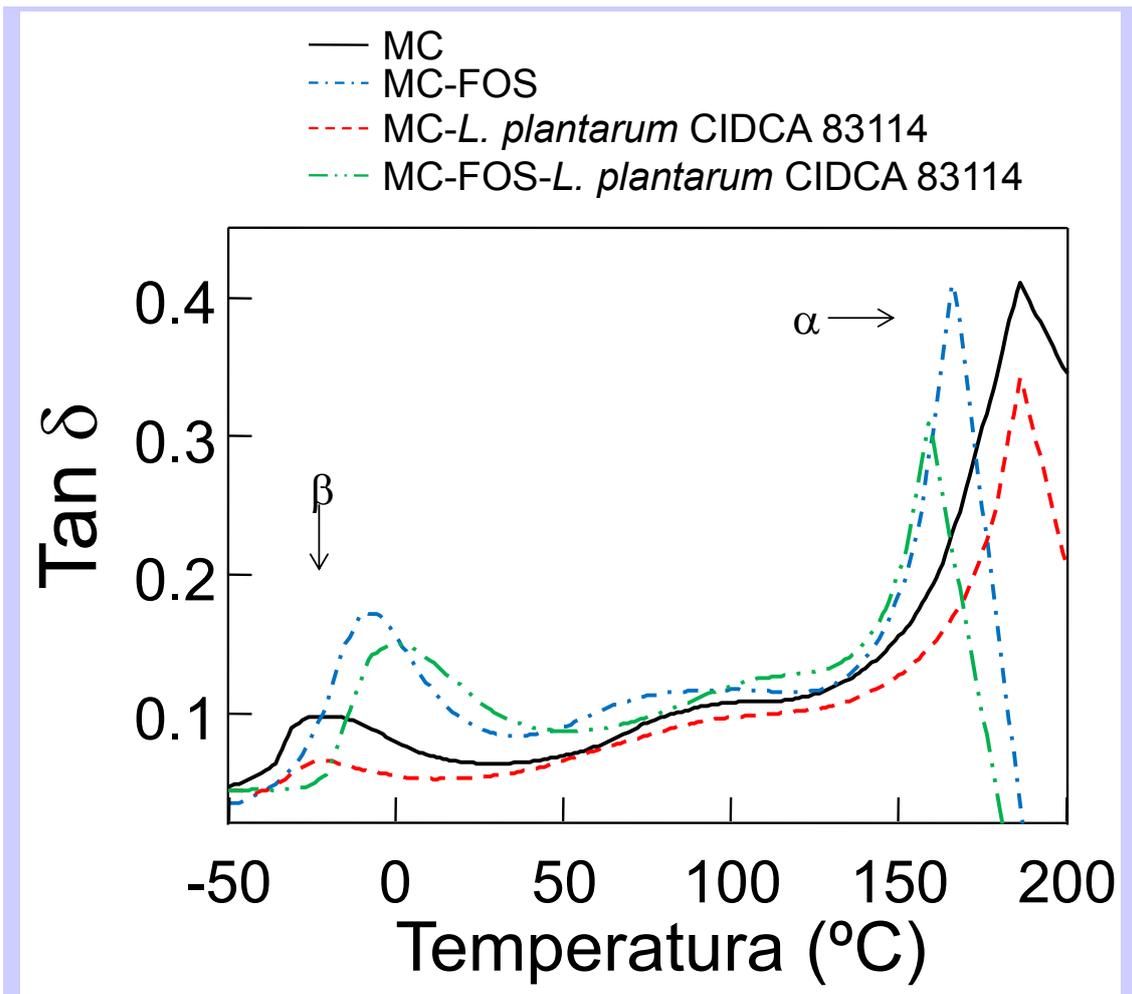
#### **4.1.4.4.2 Análisis del comportamiento termo-físico de las películas cargadas con bacterias**

Para estudiar el efecto de los diferentes componentes en las propiedades térmicas de las películas de metilcelulosa se realizaron ensayos de DMA inmediatamente después del proceso de secado. La curva de  $\tan \delta$  (línea llena negra en la Figura 4.7) muestra dos relajaciones alrededor de -21 °C, características de movimientos locales de los grupos laterales en los polisacáridos (ver Anexo A.2). Algunos autores consideran a estas relajaciones  $\beta$  de materiales hidrofílicos como relajaciones típicas del agua, producidas como consecuencia de la movilidad de los grupos OH, favorecida por el agua (Mucha & Pawlak, 2005; Fernandez-Carretero *et al.*, 2010). El segundo pico en la curva corresponde a una relajación  $\alpha$ , y la temperatura a la cual ocurre, puede considerarse como la temperatura de transición vítrea dinámica ( $T_g$ ). Esta transición se relaciona con el fenómeno de relajación debido al proceso de activación de la movilidad de regiones locales no cristalinas, el esqueleto macromolecular, partes macromoleculares específicas o grupos terminales de las cadenas macromoleculares (Samios *et al.*, 2006).



**Figura 4.6.** Contenido de humedad a 4 °C ( $\blacktriangle$ ) y  $\log N/N_0$  ( $\circ$ ) en función de  $a_w$  para películas de metilcelulosa conteniendo 3 % p/v de FOS y cargadas con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 (A) o *L. plantarum* CIDCA 83114(B).  $N$  corresponde a las UFC/g de película a cada  $a_w$ , y  $N_0$  a las UFC/g de película inmediatamente después de la deshidratación en estufa por convección forzada a 40 °C. Las líneas punteadas sólo conectan dos puntos experimentales consecutivos donde el  $\log N/N_0 \leq -5$  decrece de un punto a otro. Esta línea no representa una tendencia de la viabilidad, ya que no se tomaron datos entre estos puntos.

La incorporación de los microorganismos a la película de metilcelulosa (líneas punteadas en la Figura 4.7) no tuvo efecto en la localización de las relajaciones  $\beta$  ni en la  $T_g$ . La adición de los FOS (línea de guiones y puntos azul) interfirió con los puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilos de las moléculas poliméricas. Esta disminución de la  $T_g$  indica el efecto plastificante de los FOS. Este comportamiento fue aún más evidente en las películas conteniendo al mismo tiempo FOS y bacterias (línea de guiones roja y línea de guiones y puntos dobles verde en la Figura 4.7).



**Figura 4.7.** Efecto de la incorporación de FOS y/o bacterias en las propiedades mecánicas de las películas de MC. Línea llena (color negro), metilcelulosa; línea de guiones y puntos (color azul), metilcelulosa-FOS; línea de guiones (color rojo), metilcelulosa-*L. plantarum* CIDCA 83114; línea de guiones y puntos dobles (color verde), metilcelulosa-FOS-*L. plantarum* CIDCA 83114.

Los resultados obtenidos podrían relacionarse con el contenido de humedad. El pico de relajación  $\beta$  evidenció un desplazamiento hacia altas temperaturas, con una mejor definición del mismo, relacionada con elevados contenidos de agua (Figura 4.7). De acuerdo con Park &

Ruckenstein (2001) el cambio en la  $T_g$  indicaría compatibilidad entre FOS y metilcelulosa, así como un efecto plastificante de los FOS.

#### 4.1.4.5 Almacenamiento de las películas cargadas con bacterias

Teniendo en cuenta que los FOS son buenos protectores bacterianos pero en altas concentraciones afectan la calidad de las películas de metilcelulosa, la concentración de FOS utilizada en los ensayos fue seleccionada ponderando el efecto protector de los FOS y la calidad de las películas. Por lo tanto, la cepa *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 fue embebida en películas que contenían 3 % p/v de FOS, debido al efecto protector de los FOS sobre esta cepa (Figura 4.3 A). Por su parte, la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114 se inmovilizó en películas que contenían 1% p/v de FOS (Figura 4.3 B). Aun cuando los FOS al 1 % p/v no mostraron efecto protector sobre la supervivencia de *L. plantarum*, se decidió incorporarlos en las películas debido a sus propiedades prebióticas y a su potencial aplicación en el diseño de alimentos funcionales.

La Figura 4.8 muestra la evolución de  $\log N/N_0$  durante el almacenamiento de las películas cargadas con bacterias, equilibradas a diferentes HRs y a una temperatura de 4 °C. *L. plantarum* CIDCA 83114 mostró una mayor estabilidad durante el almacenamiento a 11, 33 y 44 % de HR (Figura 4.8A). A 33 y 44 % de HR, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 pudo ser almacenado hasta 15 días (Figura 4.8B). A 75 % de HR, no se detectaron microorganismos viables una vez alcanzado el equilibrio. *L. plantarum* CIDCA 83114 pudo ser equilibrada a 75 % HR ( $\log N/N_0$ :  $-2.05 \pm 0.25$ ), pero fue indetectable después de 15 días de almacenamiento.

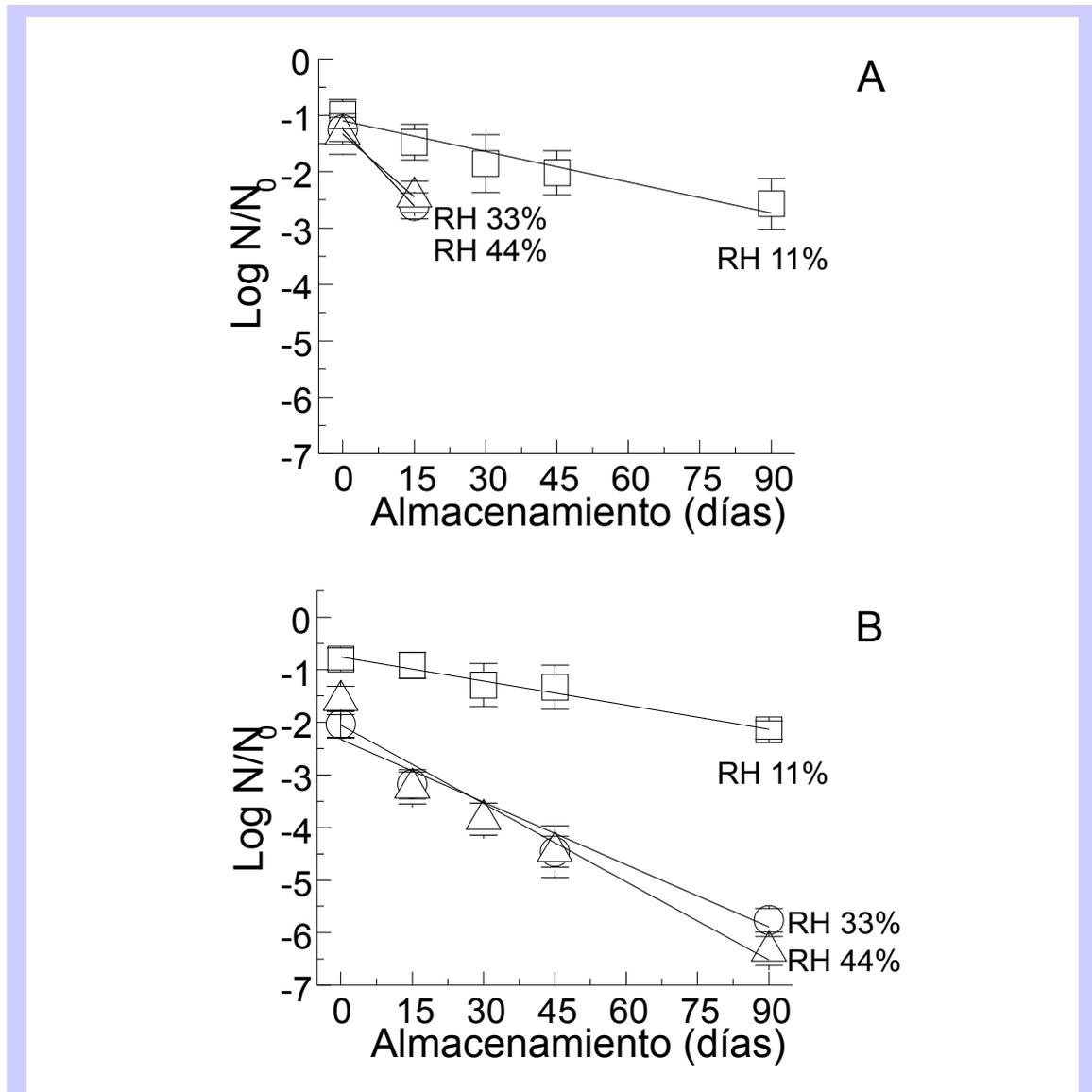
La regresión lineal de los datos representados en la Figura 4.8 permitió describir la tasa de inactivación bacteriana para cada condición de almacenamiento de acuerdo con la ecuación (4.3):

$$\log N/N_0 = -kt \quad (\text{Ec. 4.3})$$

donde  $t$  es el tiempo de almacenamiento expresado en días,  $N$  es el número de UFC/g de película a tiempo  $t$ ,  $N_0$  es el número de UFC/g de película inmediatamente después de la deshidratación en estufa de convección forzada a 40 °C, con un valor de  $(2.9 \pm 0.5) \times 10^{11}$  UFC/g para *L. plantarum* CIDCA 83114 y de  $(4.0 \pm 0.1) \times 10^8$  UFC/g para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333, y  $k$  es la constante de inactivación bacteriana (expresada en días<sup>-1</sup>) (Tabla 4.2).

Considerando que la legislación nacional (Código Alimentario Argentino art 1839; Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011) y las diferentes legislaciones internacionales (Aquilina *et al.*, 2013; Hill *et al.*, 2014; Phuapaiboon *et al.*, 2013; Tripathi & Giri, 2014) han establecido concentraciones mínimas de probióticos en los productos que los contienen ( $10^6$  UFC/g al momento de ser

consumido), los valores de  $k$  representan un importante herramienta para determinar su vida útil en las condiciones de temperatura y humedad relativa analizadas.



**Figura 4.8.** LogN/N<sub>0</sub> de los microorganismos inmovilizados en las películas de metilcelulosa almacenadas durante 90 días a 4 °C a diferentes HRs: 11% (□), 33% (○), 44% (Δ). Las líneas sólidas corresponden a las regresiones lineales para cada condición. **A:** *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 inmovilizado en películas de metilcelulosa conteniendo FOS 3 % p/v; **B:** *L. plantarum* CIDCA 83114 inmovilizado en películas de metilcelulosa conteniendo FOS 1 % p/v; N indica UFC/g de película en cada condición de almacenamiento y N<sub>0</sub>, UFC/g de película inmediatamente después de la deshidratación a 40 °C. N<sub>0</sub> fue de (2.9±0.5) × 10<sup>11</sup> UFC/g para *L. plantarum* CIDCA 83114 y (4.0±0.1) × 10<sup>8</sup> UFC/g para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333.

**Tabla 4.2.** Constantes de inactivación  $k$  de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 en películas de metilcelulosa conteniendo FOS 3 % p/v y *L. plantarum* CIDCA 83114 en películas de metilcelulosa conteniendo FOS 1 % p/v, a diferentes HRs y 4 °C.

HR	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CIDCA 333		<i>L. plantarum</i> CIDCA 83114	
	11	0.0316	R <sup>2</sup> : 0.887	0.0214
33	0.0861	R <sup>2</sup> : 0.999	0.0607	R <sup>2</sup> : 0.933
44	0.0820	R <sup>2</sup> : 0.998	0.0672	R <sup>2</sup> : 0.955

Los resultados obtenidos indican que *L. plantarum* CIDCA 83114 puede ser almacenado por períodos más largos y a mayor HR que *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 (nótese que la constante de inactivación  $k$  de *L. plantarum* CIDCA 83114 fue menor para todas las HR analizadas) (Tabla 4.2). Este comportamiento permite prever potenciales aplicaciones para las películas de metilcelulosa cargadas con bacterias. Las películas de metilcelulosa preparadas en este capítulo son livianas, de bajo costo, no ocupan grandes volúmenes y tienen una baja permeabilidad al vapor de agua ( $3.5$  a  $6.1 \times 10^{-11}$  g m<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>). Además, teniendo en cuenta que la inmovilización de microorganismos en películas de metilcelulosa sólo demora 2.5 h, esta estrategia sería adecuada para preservar y transportar diferentes bacterias lácticas, aun aquellas que son altamente sensibles a la deshidratación y al almacenamiento (e.g.: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333). La capacidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 para sobrevivir en ambientes con mayor humedad relativa, junto con sus propiedades inhibitoras contra *E. coli* O157: H7 y *Shigella* (Hugo *et al.*, 2008; Golowczyc *et al.*, 2011; Kakisu *et al.*, 2013 a y b), sustenta la aplicación de películas cargadas con esta cepa para la formulación de alimentos funcionales.



## CONCLUSIONES

En este capítulo se analizó la capacidad de las películas de metilcelulosa suplementadas con FOS como vehículo para dos cepas de lactobacilos. Para ello se realizó un enfoque integrador que incluyó tanto la caracterización fisicoquímica de las películas como la estabilidad de los microorganismos inmovilizados en las mismas.

- El agregado de FOS a películas de metilcelulosa permitió aumentar la supervivencia de los lactobacilos incluidos en ellas, aun en el caso de cepas sensibles a los procesos térmicos y de deshidratación como *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333.
- Las películas obtenidas en este trabajo tuvieron características mecánicas adecuadas. El agregado de los microorganismos no afectó dichas propiedades, en tanto que la adición de FOS ejerció un efecto plastificante, tal como lo evidenciaron otros autores (Bersaneti *et al.*, 2016).
- Las bacterias inmovilizadas en las películas de metilcelulosa mostraron elevada supervivencia aun luego de un almacenamiento de 90 días a 4 °C. La atmosfera de almacenamiento afectó la viabilidad de las bacterias, siendo las condiciones de menor HR las más adecuadas para la preservación.
- La cantidad de bacterias supervivientes por gramo de película fue superior a la recomendada por los organismos nacionales INAL y ANMAT (Código Alimentario Argentino art. 1839; Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011) e internacionales como la EFSA y la FDA (Aquilina *et al.*, 2013; Hill *et al.*, 2014.; Phuapaiboon *et al.*, 2013.; Tripathi & Giri, 2014).

Los resultados obtenidos constituyen una estrategia simple y económica para inmovilizar y almacenar bacterias lácticas de interés industrial. Además de la contribución a la preservación de las bacterias lácticas, esta estrategia sustenta potenciales aplicaciones de los microorganismos inmovilizados en el desarrollo de alimentos funcionales deshidratados que contengan probióticos y prebióticos.

## CAPÍTULO IV

### PARTE II

Funcionalización de un snack de manzana  
con *Lactobacillus plantarum* y FOS  
inmovilizados en películas de metilcelulosa

## INTRODUCCIÓN

En general, los probióticos se consumen a través de productos alimenticios y representan una parte importante del mercado de los alimentos funcionales (Tripathi & Giri, 2014; Bhadekar & Parhi, 2016). Las matrices alimenticias más utilizadas para la incorporación de probióticos son los productos lácteos (*e.g.*, yogures, leches fermentadas, helados y postres a base de leche, leche en polvo para recién nacidos, mantecas y diferentes tipos de queso) (Champagne *et al.*, 2005). A pesar de su uso extendido, las matrices lácteas presentan limitaciones tanto desde el punto de vista del efecto sobre la salud (*e.g.*, intolerancia a la lactosa, alto contenido de colesterol), como del de la aceptación de los consumidores. Por otro lado, los productos no lácteos disponibles, que provienen principalmente de la fermentación de vegetales, cereales o jugos de frutas, no están instalados en el mercado o su consumo es regional o restringido a ciertos estilos de vida. Por lo tanto, el desarrollo de productos no lácteos novedosos, como alternativa a los tradicionalmente disponibles, resulta de relevancia para la industria de los alimentos.

En este sentido, productos no lácteos, como barras de cereales, productos que contienen probióticos encapsulados, tales como jugo de manzana, chocolates, mayonesa, entre otros, y alimentos fermentados de origen vegetal, han sido utilizados como vehículos de probióticos (Champagne *et al.*, 2005; Saad, 2006; Komatsu *et al.*, 2008; Mitropoulou *et al.*, 2013). En el trabajo de Russo *et al.* (2016) se describe el desarrollo de un postre a base de avena enriquecido en riboflavina (vitamina B2) y con excelentes características reológicas, obtenido mediante

fermentación con dos cepas de la especie *Lactobacillus plantarum*, una sobreproductora de riboflavina y la otra, de exopolisacárido.

El uso de tecnologías como la impregnación a vacío, la encapsulación o el recubrimiento de alimentos con películas comestibles (Noorbakhsh *et al.*, 2013; Romano *et al.*, 2014; Gaudreau *et al.*, 2016), facilita la incorporación de bacterias lácticas probióticas y/o componentes bioactivos en matrices alimenticias diversas. En este sentido, la utilización de *snacks* como matrices alimentarias para la incorporación de probióticos puede ser una estrategia adecuada debido a que su consumo se encuentra ampliamente difundido en diferentes franjas etarias.

#### **4.II.1.1 Snacks como alimentos funcionales**

Se entiende por *snack* a aquellos productos de fácil consumo, accesibles, de tamaño pequeño (sólido o líquido), que requieren poca o ninguna preparación antes de su consumo y cuya finalidad es satisfacer la sensación de hambre que se produce entre comidas (Lusas & Rooney, 2002).

El consumo de *snacks* presenta una demanda sostenida. La agencia de estudios de mercado Mintel (Mintel Group Ltd, Londres, Reino Unido) publicó una encuesta sobre el consumo de *snacks* en los Estados Unidos en el año 2015 (*Snacking Motivations and Attitudes - US - April 2015*) y los resultados mostraron que más del 94% de los encuestados consumía *snacks* al menos una vez al día, siendo 50 % el porcentaje de adultos que los consumía de 2 a 3 veces por día. El consumo es diferente en función de la edad. Así, el segmento de entre 21 y 38 años (*millennials*) presentó mayor preferencia que los adultos (55 a 62 años). Las razones que motivan el consumo de *snacks* son diversas: necesidad energética y mantenerse concentrado durante el día (39 %), estrés (17 %), aburrimiento (27 %), entre las más relevantes. La preferencia por los *snacks* saludables, especialmente aquellos de un solo ingrediente y/o reducidos en calorías, fue del 33 %. Contrariamente, un 62% de los encuestados afirmó consumir *snacks* para satisfacer la ansiedad entre comidas y mostró preferencia por el sabor y el aroma por sobre la nutrición (*Snacking Motivations and Attitudes - US - April 2015*). Si bien en Argentina no existen estudios similares, es posible que las motivaciones para el consumo de *snacks* sean semejantes.

Teniendo en cuenta que el consumo de *snacks* es un hábito ampliamente difundido en todo el mundo, estos productos podrían ser matrices apropiadas para el suministro de bacterias probióticas. Sin embargo, el desarrollo de *snacks* funcionalizados con probióticos plantea diferentes desafíos. Teniendo en cuenta que se trata de productos deshidratados, los tratamientos térmicos y el estrés mecánico y osmótico podrían tener efectos indeseados para los microorganismos (*e.g.*, daños en las estructuras bacterianas y/o pérdidas de viabilidad) (ver página 14 de la Introducción general).

Asimismo, el efecto de la adición de probióticos sobre las propiedades del producto final (crocancia, textura, color, etc.) también debe ser considerado. De acuerdo a nuestro conocimiento, son escasos los antecedentes relacionados con el desarrollo de *snacks* funcionalizados con probióticos. En efecto, Betoret *et al.* (2012) describen el desarrollo de un *snack* a base de manzana deshidratada funcionalizado mediante impregnación por vacío con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* y deshidratado por convección forzada. El *snack* obtenido demostró ser un soporte adecuado para el probiótico, la viabilidad del mismo luego del secado fue de  $(9.486 \pm 0.013) \times 10^7$  UFC/g <sub>producto seco</sub> y presentó un potencial efecto contra infecciones causadas por *Helicobacter pylori*, como lo describen los autores en ensayos preliminares in vivo. Noorbakhsh *et al.* (2013) desarrollaron un *snack* de manzana funcionalizado con una cepa probiótica de la especie *L. rhamnosus* mediante impregnación en vacío y deshidratación. Los autores compararon tres técnicas de secado: secado por convección (40 °C, flujo de aire de 8 m/min, 28 h), liofilización (25 °C, 72 h) y una combinación de secado por convección (40 °C, 3 h) y microondas asistido por vacío (1200 W, 9 min; 600 W, 3 min). La supervivencia del probiótico demostró ser dependiente del tipo de secado empleado, siendo la liofilización el más adecuado. Las otras técnicas de deshidratación provocaron un mayor efecto sobre la viabilidad. Asimismo, la viabilidad bacteriana durante el almacenamiento y la resistencia al pasaje a través del tracto gastro-intestinal simulado mostraron una relación directa con el tipo de secado, siendo la liofilización la que produjo menor pérdida de la viabilidad durante estos ensayos (Noorbakhsh *et al.*, 2013). Si bien estos trabajos coinciden en la matriz empleada y en el uso de probióticos no contemplan el uso de prebióticos en su desarrollo por lo cual, según nuestro conocimiento, en este capítulo describimos el primer desarrollo de un *snack* simbiótico de bajo contenido de humedad. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se desprende que el desarrollo de *snacks* funcionalizados con probióticos requiere un estricto análisis de los aspectos mencionados.

#### **4.II.1.2 Prebióticos como protectores de probióticos en el tracto gastrointestinal**

Los efectos benéficos de un probiótico en el intestino dependen en parte de la supervivencia bacteriana durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal, donde deben enfrentarse al efecto inhibitorio del contenido ácido del estómago, de las enzimas líticas del duodeno y de las sales biliares. La resistencia a condiciones tan drásticas es cepa dependiente. Para evitar el efecto agresivo de este ambiente, han sido desarrollados diferentes métodos de encapsulación. En este sentido, han sido usadas cápsulas de polisacáridos funcionalizadas con prebióticos (*e.g.*, inulina, FOS, GOS) para proteger diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* de los fluidos gástricos e intestinales *in vitro* (And & Kailasapathy, 2005; Chávarri *et al.*, 2010). La adición de compuestos prebióticos a las

bacterias encapsuladas no sólo garantiza su llegada al intestino sin ser degradadas en la parte superior del tracto gastrointestinal (definición de prebiótico, Gibson *et al.*, 2004), sino que también puede ser una fuente de energía para los probióticos cuando alcanzan el colon. Diferentes combinaciones de probiótico-cápsula-prebiótico han demostrado un efecto protector sobre la supervivencia del probiótico en las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal. En tal sentido, varios autores mostraron que la encapsulación de cepas de *Lactobacillus sp.* con alginato suplementado con inulina y péptidos (Chen *et al.*, 2005), alginato-xantano con FOS (Nazzaro *et al.*, 2009) o alginato-quitosano con almidón resistente Hi-Maize (Iyer & Kailasapathy, 2005), FOS Raftilose® (Anjani *et al.*, 2004), inulina o GOS (Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014) protege a los microorganismos durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal. Asimismo, ha sido demostrado que cápsulas lipídicas adicionadas de inulina o povidona son eficientes en la protección de *Lactobacillus acidophilus* expuestos a condiciones gastrointestinales simuladas (Okuro *et al.*, 2013). Por su parte, la supervivencia de cepas de *Bifidobacterium* en condiciones gastrointestinales simuladas aumentó cuando se utilizaron cápsulas de alginato adicionadas de péptidos e inulina (Chen *et al.*, 2005), cápsulas de alginato-quitosano adicionadas de FOS Raftilose® (Anjani *et al.*, 2004), inulina o GOS (Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014), o cápsulas de goma gellan-alginato adicionadas de FOS (Chen *et al.*, 2007). Asimismo, la co-encapsulación de los probióticos *Staphylococcus succinus* (MAbB4) y *Enterococcus faecium* (FIdM3) en matrices de alginato e inulina obtenida de remolacha y achicoria mejoró la resistencia al pasaje a través del tracto gastrointestinal, en comparación con los mismos microorganismos no encapsulados. En efecto, las células encapsuladas mostraron alrededor del 89-99 % de supervivencia en el ambiente gastrointestinal y la viabilidad se mantuvo hasta 30 días a 4 °C (Sathyabama *et al.*, 2014).

#### **4.II.1.3 Diseño de *snacks* funcionalizados con bacterias lácticas potencialmente probióticas**

En la primera parte de los ensayos presentados en este capítulo se inmovilizó eficientemente cepas de bacterias lácticas en películas de metilcelulosa. Se estudió el efecto sobre la viabilidad celular durante el secado por convección, el efecto protector de FOS comerciales en dicho proceso y la estabilidad del sistema durante el almacenamiento. Sin embargo, su incorporación en el desarrollo de alimentos funcionalizados con bacterias lácticas potencialmente probióticas requiere de estudios adicionales. En concreto, una eficiente incorporación de probióticos en *snacks* requiere considerar tanto la factibilidad tecnológica (tolerancia a la deshidratación, buen rendimiento de biomasa, etc.) como la capacidad de los microorganismos para sobrevivir durante la vida útil del producto y durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal. De hecho, no todas las cepas son capaces de

sobrevivir al procesamiento tecnológico y al almacenamiento, y las condiciones del tracto gastrointestinal (pH ácido, sales biliares, etc) son perjudiciales para muchas de ellas (Rajam *et al.*, 2012; Senaka Ranadheera *et al.*, 2014; Tripathi & Giri, 2014).

El tratamiento térmico en la producción de *snacks* deshidratados es un paso crítico, ya que las altas temperaturas utilizadas para obtener productos crocantes y quebradizos pueden resultar perjudiciales para los microorganismos. Es importante mencionar que la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) y la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) sugieren concentraciones de bacterias vivas de entre  $10^6$  y  $10^7$  UFC/g alimento al momento de ser ingerido para poder decir que el alimento contiene probióticos (Hill *et al.*, 2014; Tripathi & Giri, 2014; Código Alimentario Argentino, artículo 1389; Gaudreau *et al.*, 2016).



## OBJETIVOS

Considerando los antecedentes expuestos, esta segunda parte del capítulo se centra en el desarrollo de un *snack* de manzana funcionalizado con películas de metilcelulosa funcionalizadas con *L. plantarum* CIDCA 83114 y FOS. Par tal fin se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Recubrir *snacks* de manzana previamente deshidratados con soluciones filmogénicas de metilcelulosa, FOS y *L. plantarum* CIDCA 83114.
- Estudiar el efecto del secado secundario de los *snacks* funcionalizados sobre la viabilidad celular.
- Estudiar la calidad del *snack* obtenido, sus propiedades fisicoquímicas (humedad, color, textura,  $T_g$ ) y organolépticas (mediante un panel sensorial).
- Evaluar la viabilidad de los microorganismos adicionados al *snack* durante 90 días de almacenamiento a 20 °C, en bolsas termo-selladas a 60 % de humedad relativa (condiciones usuales de almacenamiento de *snacks*).
- Evaluar la resistencia de las bacterias inmovilizadas en el *snack* a condiciones gastrointestinales simuladas, inmediatamente después de la obtención del producto y durante el almacenamiento.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.II.3.1 Preparación del cultivo stock y condiciones de crecimiento

Se utilizó la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114, aislada de gránulos de kefir (Garrote *et al.*, 2001). Se partió del cepario congelado en leche descremada a -80 °C. Los microorganismos fueron reactivados en caldo MRS a 30 °C en aerobiosis durante 24 horas. Los microorganismos activos fueron inoculados al 1 % v/v en MRS y crecidos a 30 °C. Una vez alcanzada la fase estacionaria (20 h de cultivo,  $2 \times 10^{10}$  UFC/mL), las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a  $7000 \times g$  durante 10 min y lavadas dos veces con NaCl 0.85% p/v.

### 4.II.3.2 Preparación de la solución filmogénica

La solución filmogénica se preparó como se indicó anteriormente (sección 4.I.3.1). Luego se adicionó FOS (Orafti p95 Beneo, Alemania) a la solución en una concentración final de 3 % p/v. La solución se esterilizó con filtros esterilizantes (tamaño del poro 0.2 micras). El pellet bacteriano (sección 4.II.3.1) fue incorporado en 4 mL de la solución filmogénica, de manera de obtener una concentración bacteriana de  $3.1 \times 10^{11} \pm 0.3 \times 10^{11}$  UFC/mL en la solución.

#### **4.II.3.3 Preparación del snack de manzana**

Para la preparación del *snack* se cortaron rodajas de manzana de  $2.0 \pm 0.2$  mm de espesor y se las impregnó con una solución de gluconolactato de calcio (grado alimentario, Jungbunzlauer, Alemania) durante 2 min, y se adicionó ácido ascórbico en una concentración 2 % p/v. Las rodajas de manzana impregnadas fueron posteriormente deshidratadas osmóticamente por inmersión en una solución de isomalt 30 % p/v, (Beneo-Palatinit, Alemania) y maltodextrina (grado alimentario, Parafarm, Argentina) en una proporción 2:1. Luego de la inmersión, las rodajas de manzana fueron horneadas durante 30 min a 140 °C en un horno de convección forzada para obtener el *snack*. Para el recubrimiento, se pinceló la superficie de cada rodaja horneada de *snack* con 100 µL de la solución filmogénica que contenía bacterias.

Para el secado, se evaluaron diferentes combinaciones de temperatura/tiempo: 140 °C/3 min; 100 °C/5 min; 80 °C/20 min, 60 °C/50 min y 50 °C/90 min. Para cada temperatura, el tiempo de secado fue optimizado procurando la recuperación de las características físicas y sensoriales de los *snacks* no recubiertos, y maximizando la viabilidad bacteriana.

Luego de los pasos de secado, los *snacks* fueron envasados en bolsas de polipropileno termo-selladas (Vitopel S.A., Argentina) y almacenados a 20 °C y 60 % de humedad relativa (HR) en una cámara con control de temperatura y humedad. Como control se utilizaron *snacks* no recubiertos.

#### **4.II.3.4 Propiedades fisicoquímicas de los *snacks***

Luego del secado se determinó el contenido de humedad, la textura y el color de las muestras y luego de 15, 30, 45, 60 y 90 días de almacenamiento (sección 4.II.3.3). Como control se utilizaron *snacks* no recubiertos.

##### **4.II.3.4 .1 Determinación del contenido de humedad**

Se determinó el contenido de humedad de los *snacks* midiendo la pérdida de peso luego del secado en un horno de vacío a 70 °C hasta peso constante (AOAC 1980). Los resultados de humedad se expresaron como gramos de agua por 100 g de muestra seca (b.s.).

##### **4.II.3.4 .2 Análisis de textura**

La textura de los *snacks* se evaluó a 20 °C en un texturómetro TA.XT2i (Stable Micro Systems, Inglaterra) mediante el uso de una sonda semi-esférica de 5 mm de diámetro a una velocidad constante de 1 mm/s (Tavera-Quiroz *et al.*, 2014) (Anexo A.3).

#### 4.II.3.4 .3 Mediciones de color

El color de los *snacks* se determinó usando un colorímetro Minolta CR 400 Series (Japón). Se utilizó la escala CIELab, y se midieron los parámetros de luminosidad (L) y cromaticidad a\* (rojo-verde) y b\* (amarillo-azul) (Anexo A.4). El índice de pardeamiento o *browning* (BI) se calculó usando la ecuación descrita en Tavera-Quiroz *et al.* (2014):

$$BI = \frac{100}{0.172} \left( \frac{a^* + 1.75 L}{5.645 L + a^* - 3.012 b^*} - 0.31 \right) \quad \text{Ec. 4.3}$$

#### 4.II.3.5 Viabilidad bacteriana

Cada rodaja de *snack* (0.500 g) se trituró suavemente y re-hidrató completamente con 5 mL de NaCl 0.85 % p/v durante 10 min. Las suspensiones obtenidas se diluyeron en serie, se sembraron en agar MRS e incubaron a 30 °C durante 24 h. Este proceso se llevó a cabo inmediatamente después del secado en las condiciones óptimas y durante el almacenamiento (a 15, 30, 45, 60 y 90 días) (sección 4.II.3.3).

#### 4.II.3.6 Análisis de la microestructura mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras fueron depositadas cuidadosamente sobre tiras de carbono (Agar Scientific, Stansted, Reino Unido), y luego recubiertas con carbono y colocadas en un soporte. La adquisición de imágenes se realizó a bajo vacío en un microscopio electrónico de barrido (FIM-SEM, FEI, Hillsboro, Estados Unidos). Las imágenes fueron adquiridas con un voltaje de aceleración de 5 kV. Las observaciones se realizaron inmediatamente después de la obtención de los *snacks*, antes del almacenamiento (sección 4.II.3.3).

#### 4.II.3.7 Propiedades térmicas

Las propiedades térmicas de los *snacks* de manzana obtenidos en la sección XX se determinaron utilizando un calorímetro diferencial de barrido DSC-Q100 controlado por un módulo TA 5000 (TA Instruments, New Castle, Estados Unidos). La primera exploración se realizó en el rango de -70 °C a 200 °C, a 10 °C/min. Después de completar la primera exploración, las muestras se enfriaron hasta -70 °C, y a continuación se realizó una segunda exploración entre -70 y 250 °C, a 10 °C/min. Las

temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ) se obtuvieron a partir de los termogramas, utilizando el software de análisis universal V1.7F (TA Instruments, New Castle, Estados Unidos). Como control se utilizaron *snacks* no recubiertos.

#### **4.II.3.8 Análisis de las propiedades funcionales**

##### **4.II.3.8.1 Digestión in vitro**

Se determinó el efecto de condiciones gastrointestinales simuladas sobre la viabilidad de *L. plantarum* CIDCA 83114, luego de la obtención del *snack* y durante el almacenamiento a 20 °C. El ensayo se realizó en los días 0, 30, 60 y 90 y se dividió en dos etapas. Primero se evaluó la digestión gástrica (pepsina, pH 2.5) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y luego la digestión intestinal (pancreatina, sales biliares, pH 7.5) (Sigma Aldrich, EE.UU.). Para realizar el ensayo se trituró 0.50 g de *snack* (1 rodaja), y se adicionó 2.5 mL de NaCl 0.85 % p/v. A esta suspensión se le agregó jugo gástrico simulado concentrado, compuesto de pepsina porcina 3200 unidades/mL, CaCl<sub>2</sub> 7.2mM, MgCl<sub>2</sub> 3mM, NaCl 98mM, KCl 24mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12.8 mM (pH 2.5 ajustado con HCl diluido). Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C bajo agitación continua (130 rpm, Max Q 4000, Thermo Scientific, Estados Unidos). La etapa de la digestión gástrica fue detenida aumentando el pH a 6.5 con una solución de NaOH. La etapa de la digestión intestinal se realizó agregando jugo intestinal simulado, compuesto de 10 mg/ml de pancreatina, 20 mg/ml de sales biliares y NaHCO<sub>3</sub> 100 mM (pH 7.5). La suspensión resultante se incubó durante 2 horas a 37 °C, bajo agitación continua. Después de cada etapa, se tomó alícuotas de 1 mL y se realizó un recuento en placa, tal como se explicó en la sección 4.II.3.5.

##### **4.II.3.8.2 Análisis sensorial**

Se efectuó un panel sensorial para evaluar la aceptabilidad de los *snacks* recubiertos con películas de metilcelulosa y *L. plantarum* CIDCA 83114. El ensayo se realizó con un panel compuesto por 50 evaluadores con experiencia en evaluación sensorial seleccionados dentro del personal del CIDCA (La Plata, Argentina), que manifestaron ser consumidores habituales de este tipo de productos, y cuyas edades estuvieron entre 25 y 55 años. Las muestras fueron codificadas al azar y presentadas a los panelistas en bandejas enumeradas junto con las instrucciones para la evaluación. Los atributos analizados fueron la apariencia, color, textura, sabor y aceptabilidad general, utilizando una escala hedónica de nueve puntos para cada uno. Además, se pidió a los panelistas indicar la puntuación de cada muestra en una escala desde 1 (disgusta) a 9 (gusta). Se consideró una

puntuación igual a cinco como umbral mínimo de aceptabilidad. Para cada uno de estos atributos se determinó la frecuencia relativa de las respuestas de los panelistas.

#### **4.II.3.9 Análisis estadístico**

Los experimentos se realizaron por triplicado. Las diferencias relativas fueron reproducibles independientemente del cultivo utilizado. Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con el programa Infostat v2009 (Córdoba, Argentina). La comparación de medias se realizó aplicando el test de medias LSD de Fisher. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para valores de  $P < 0.05$ .



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

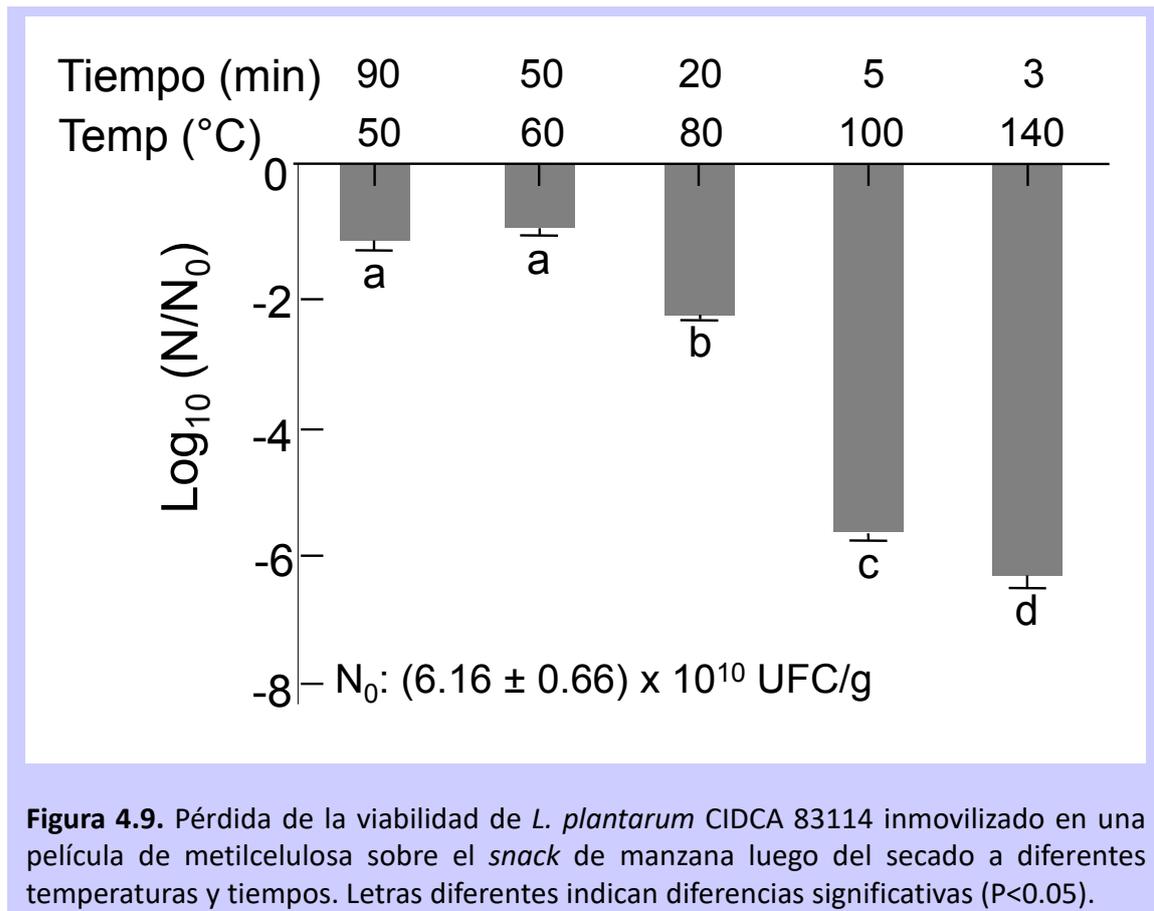
### 4.II.4.1 Proceso de secado del *snack* funcionalizado

Para el diseño de los *snacks* de manzana fue necesario superar dos desafíos importantes:

-**la incorporación de microorganismos en el *snack***: se decidió elaborar los *snacks* en dos etapas. En una primera etapa se hornearon los *snacks* a las temperaturas necesarias para obtener productos crocantes y quebradizos (140 °C, 30 min). En una segunda etapa, se adicionaron las bacterias suspendidas en soluciones filmogénicas de metilcelulosa, pincelando la superficie superior de los *snacks* ya horneados. Para evitar el re-humedecimiento de los *snacks* (y consecuente deterioro de sus propiedades organolépticas y textura), los *snacks* fueron recubiertos sólo en su superficie superior con una fina capa de solución filmogénica (100 µL) que contenía *L. plantarum* CIDCA 83114. En ese pequeño volumen había inicialmente  $(6.2 \pm 0.6) \times 10^{10}$  UFC/g *snack* (valor de  $N_0$ ).

-**la relación tiempo/temperatura** representó un segundo desafío, ya que debía permitir la formación de la película de metilcelulosa y al mismo tiempo, no ser perjudicial para los microorganismos. En los estudios previos (sección 4.I.4.2) había sido definida la combinación de 2.5 h a 40 °C para la obtención de las películas de metilcelulosa cargadas con *L. plantarum* CIDCA 83114 (Romano *et al.*, 2014). Sin embargo, en el caso del *snack* fueron necesarios tiempos menores debido a que el volumen de la solución filmogénica era menor (100 µL vs 1500 µL) (Romano *et al.*, 2014). Para definir esta nueva relación tiempo/temperatura de secado fue necesario ensayar diferentes combinaciones y determinar la pérdida de viabilidad bacteriana (Figura 4.9) y las características de

los *snacks* obtenidos. Se observó que el uso de temperaturas por encima de 80 °C durante períodos cortos permitió la obtención de *snacks* de buena calidad en términos visuales y sensoriales. A pesar de estas ventajas, estas condiciones provocaron pérdidas elevadas de viabilidad bacteriana (superiores a 3 log UFC/g). La utilización de temperaturas bajas produjo una menor pérdida de viabilidad pero requirió mayores tiempos de secado. Por ello se decidió secar a 60 °C durante 50 min, ya que fue la condición que permitió obtener una menor pérdida de viabilidad con un menor tiempo de secado (Figura 4.9).



Esta condición permitió obtener un producto de contenido de agua, crocancia y aspecto visual similares a aquellos observados antes de la aplicación del recubrimiento, sin afectar significativamente la viabilidad de los microorganismos (Figura 4.10).

#### 4.II.4.2 Propiedades microbiológicas de los *snacks* funcionalizados

Es sabido que para ejercer su efecto probiótico, las bacterias deben llegar vivas y en cantidades suficientes al intestino. Para lograr este objetivo deben superar las condiciones gástricas (pH bajo, acción de proteasas) e intestinales (sales biliares, proteasas, lipasas, nucleasas). Por lo tanto, antes

de asegurar que un alimento funcional posee potencial probiótico debe evaluarse la viabilidad de los microorganismos durante la digestión gastrointestinal.

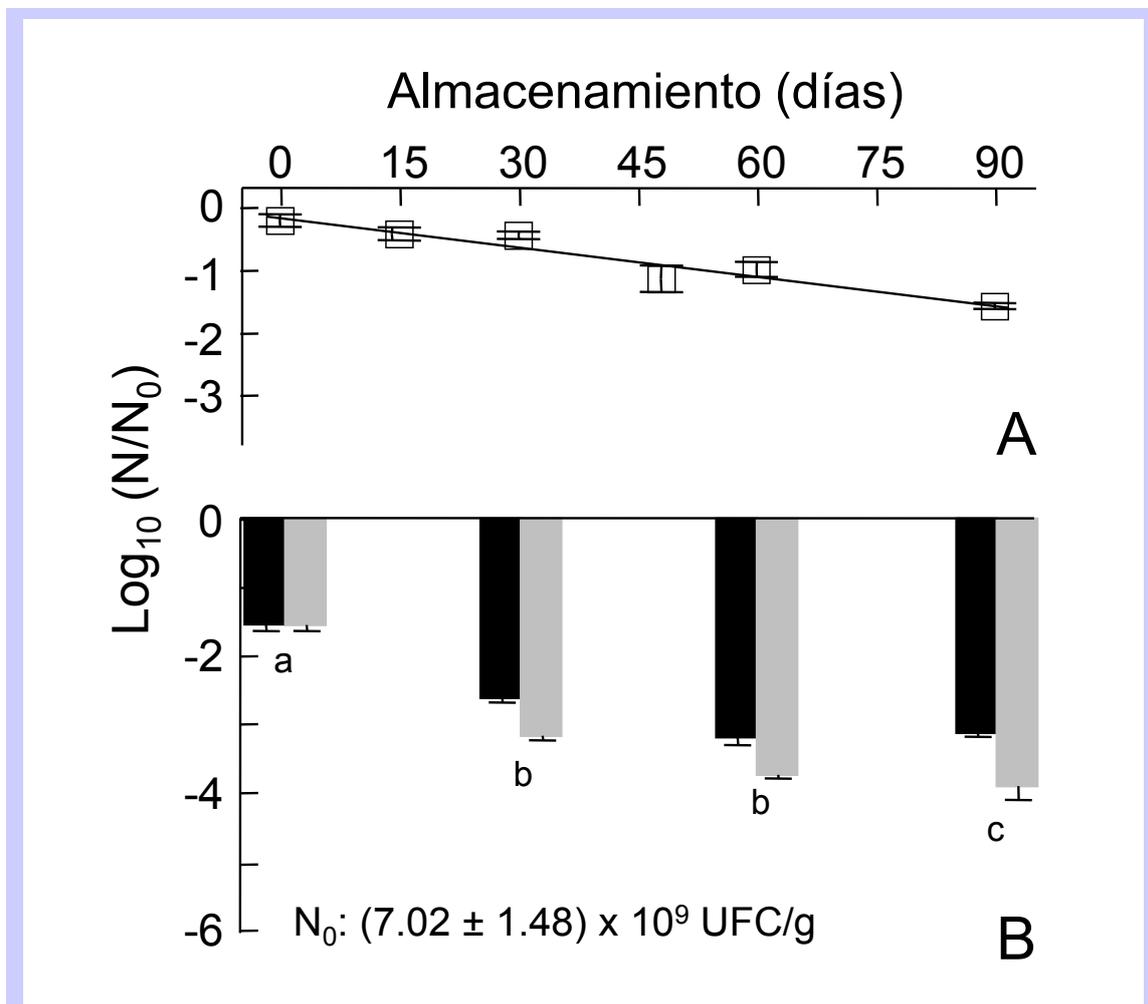


Considerando que el almacenamiento provoca daños sub-letales a los microorganismos, y que los microorganismos dañados son más susceptibles a cualquier condición perjudicial (Tymczyszyn *et al.*, 2007a y b), se evaluó el efecto de la digestión gástrica e intestinal simulada no solamente después de la preparación de los *snacks* ( $t=0$  días) sino también a lo largo del almacenamiento a 20 °C y 60 % HR durante 90 días. Los resultados de la pérdida de viabilidad durante el almacenamiento se muestran en la Figura 4.11A y los resultados de la pérdida de viabilidad luego del almacenamiento seguido de la digestión gástrica e intestinal simulada, en la Figura 4.11B.

Antes del almacenamiento, los *snacks* de manzana recubiertos mostraron una carga inicial ( $N_0$ ) de  $(7.02 \pm 1.48) \times 10^9$  UFC/g. Esta concentración disminuyó  $(1.54 \pm 0.10)$  log UFC/g después de simular las condiciones gástricas, llegando a  $(2.40 \pm 0.65) \times 10^8$  UFC/g. La viabilidad no se redujo en forma significativa después de la digestión intestinal simulada [ $(2.03 \pm 0.4) \times 10^8$  UFC/g] ( $p > 0.05$ ).

El almacenamiento a 20 °C y 60 % HR provocó una ligera disminución de la viabilidad bacteriana después de 90 días  $(1.43 \pm 0.10)$  log UFC/g. A pesar de esto, la concentración bacteriana [ $(2.0 \pm 0.7) \times 10^8$  UFC/g] se mantuvo por encima de los requerimientos mínimos de los organismos nacionales e

internacionales ( $10^6$ - $10^7$  UFC/g) (Hill *et al.*, 2014; Tripathi & Giri, 2014; Código Alimentario Argentino art. 1389, 2011).



**Figura 4.11.** Pérdida de la viabilidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 inmovilizado sobre el *snack* de manzana a diferentes tiempos de almacenamiento (A, □), y del *snack* almacenado expuesto a la digestión gástrica simulada (B, barras negras) y luego expuesto a la digestión intestinal simulada (B, barras grises). Los valores representados son el promedio de tres determinaciones independientes  $\pm$ DS.

Si bien la disminución de la viabilidad luego 90 días almacenamiento fue baja, la digestión gastrointestinal luego de este periodo provocó una disminución pronunciada de la viabilidad bacteriana [ $3.11 \log$  UFC/g;  $(5.51 \pm 0.70) \times 10^5$  UFC/g] e intestinal [ $(9.83 \pm 0.45) \times 10^5$  UFC/g]. Esto sugiere que el daño sufrido por los microorganismos durante el secado y su posterior almacenamiento disminuyó significativamente la estabilidad de las bacterias frente a las condiciones gastrointestinales. Estos resultados confirman que la capacidad de las bacterias para superar las barreras fisiológicas no está necesariamente relacionada con su capacidad para sobrevivir a las condiciones de almacenamiento. Por esta razón, la determinación del efecto de las condiciones

gastrointestinales simuladas sobre la viabilidad bacteriana post-almacenamiento constituye una evaluación importante, ya que no hacerlo conduciría a sobre-estimaciones de las concentraciones bacterianas que llegan al intestino.

A pesar de las pérdidas de viabilidad mencionadas, es importante destacar que aun en condiciones de estrés máximo (almacenamiento prolongado y digestiones gástrica e intestinal simuladas consecutivas) la concentración de *L. plantarum* CIDCA 83114 que llega al intestino es lo suficientemente alta  $[(9.83 \pm 0.45) \times 10^5 \text{ UFC/g}]$  como para asegurar que la ingestión de 25 g del *snack* permitiría alcanzar la concentración de microorganismos requerida para ejercer un efecto benéfico.

#### 4.II.4.3 Propiedades físicas, químicas y nutricionales de los *snacks* recubiertos

Se estudió la evolución de diferentes propiedades (contenido de humedad, color, parámetros mecánicos) de los *snacks* recubiertos con las películas de metilcelulosa cargadas con *L. plantarum* CIDCA 83114 durante el almacenamiento (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3.** Contenido de humedad, color y parámetros mecánicos de los *snacks* de manzana recubiertos con películas de metilcelulosa cargadas con *L. plantarum* CIDCA 83114 y almacenados durante 0, 15, 30, 45 y 90 días a 20 °C y 60 % HR. Control: *snack* no recubierto.

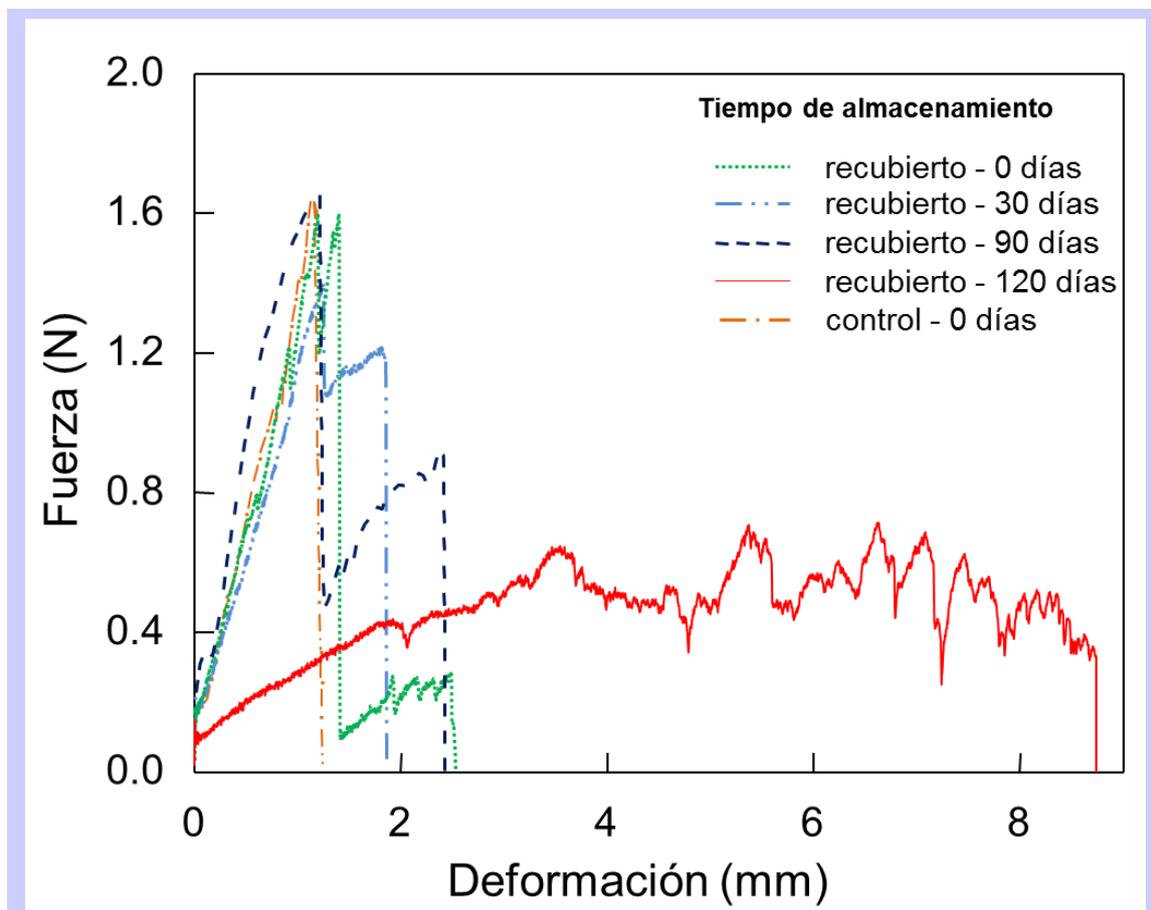
Producto	Tiempo (días)	Humedad ( $g_{agua}/100g_{b.s.}$ )	Luminosidad (L)	Índice Browning (BI)	Deformación (mm)	Módulo elástico (N/m)
Control	0	1.8 <sup>a,b*</sup> (0.4)**	64.0 <sup>a,b</sup> (1.2)	44.0 <sup>a</sup> (2.2)	1.2 <sup>a,b</sup> (0.1)	1.1 <sup>a,b</sup> (0.1)
	30	1.4 <sup>a</sup> (0.1)	63.0 <sup>a</sup> (1.7)	44.0 <sup>a</sup> (2.2)	1.2 <sup>a,b</sup> (0.2)	1.3 <sup>b</sup> (0.2)
	45	2.7 <sup>b,c,d</sup> (0.2)	63.2 <sup>a,b</sup> (0.8)	45.0 <sup>a,b</sup> (1.4)	1.3 <sup>a,b</sup> (0.3)	0.9 <sup>a,b</sup> (0.2)
	60	3.2 <sup>d,e</sup> (0.6)	63.0 <sup>a,b</sup> (1.1)	46.0 <sup>a,b</sup> (1.1)	1.3 <sup>a,b</sup> (0.1)	0.82 <sup>a,b</sup> (0.03)
	90	3.8 <sup>e</sup> (0.6)	67 <sup>a,b</sup> (1.4)	45.0 <sup>a,b</sup> (1.3)	1.6 <sup>b</sup> (0.2)	0.61 <sup>a</sup> (0.01)
<i>Snack</i> recubierto	0	3.0 <sup>b*</sup> (0.3)**	69.0 <sup>b</sup> (1.5)	57.0 <sup>c</sup> (2.9)	0.82 <sup>a</sup> (0.07)	1.1 <sup>a,b</sup> (0.2)
	15	2.5 <sup>b,c,d</sup> (0.9)	70.0 <sup>b</sup> (1.6)	51.0 <sup>b,c</sup> (1.5)	1.2 <sup>a,b</sup> (0.2)	1.2 <sup>a,b</sup> (0.2)
	30	2.6 <sup>b,c,d</sup> (0.4)	65.0 <sup>a,b</sup> (1.1)	55.0 <sup>c</sup> (2.1)	1.1 <sup>a,b</sup> (0.1)	0.99 <sup>a,b</sup> (0.03)
	45	2.4 <sup>b,c</sup> (0.9)	66.3 <sup>a,b</sup> (0.8)	50.0 <sup>b,c</sup> (2.9)	1.0 <sup>a</sup> (0.1)	1.0 <sup>a,b</sup> (0.4)
	60	3.1 <sup>d,e</sup> (0.4)	62.0 <sup>a</sup> (1.5)	53.0 <sup>c</sup> (3.9)	1.23 <sup>a,b</sup> (0.05)	1.18 <sup>a,b</sup> (0.01)
	90	2.5 <sup>b,c,d</sup> (0.4)	66.0 <sup>a,b</sup> (1.4)	52.0 <sup>c</sup> (2.3)	1.1 <sup>a</sup> (0.3)	1.2 <sup>a,b</sup> (0.3)

\* Letras diferentes indican diferencias significativas entre los *snacks* ( $p < 0.05$ ).

\*\* Los valores entre paréntesis representan la desviación estándar.

Los *snacks* horneados a 140 °C durante 30 min sin recubrimiento (controles) presentaron un contenido de humedad de 1.8 % (b.s). En el producto recubierto, el contenido de humedad obtenido fue significativamente más alto (aproximadamente el doble) ( $p < 0.05$ ) y este valor se mantuvo después de 90 días de almacenamiento (Tabla 4.3).

Las curvas de fuerza-deformación obtenidas para el control y para los *snacks* recubiertos antes del almacenamiento (día 0), mostraron patrones similares y típicos de productos crocantes (valores elevados de fuerza y valores bajos de deformación en el máximo de ruptura). El perfil de textura de los *snacks* recubiertos con la película de metilcelulosa y bacterias, se caracterizó por una fuerza de ruptura promedio de 1.6 N. No se observaron diferencias significativas hasta los 90 días de almacenamiento ( $p > 0.05$ ). Esta tendencia se obtuvo también para los valores de deformación de las muestras antes de la ruptura, que fueron bajos (del orden de 2 mm) (Figura 4.12).



**Figura 4.12.** Comportamiento mecánico (curvas de fuerza vs deformación) de los *snacks* de manzana recubiertos con películas de metilcelulosa cargadas con *L. plantarum* CIDCA 83114. *Snack* control sin recubrimiento día 0 de almacenamiento (curva de guiones y puntos; color naranja). *Snack* con recubrimiento almacenado a 20 °C y 60 % HR: día 0 (línea de puntos; color verde), día 30 (línea de guiones y puntos dobles; color celeste), día 90 (línea de guiones; color azul) y día 120 (línea continua; color rojo).

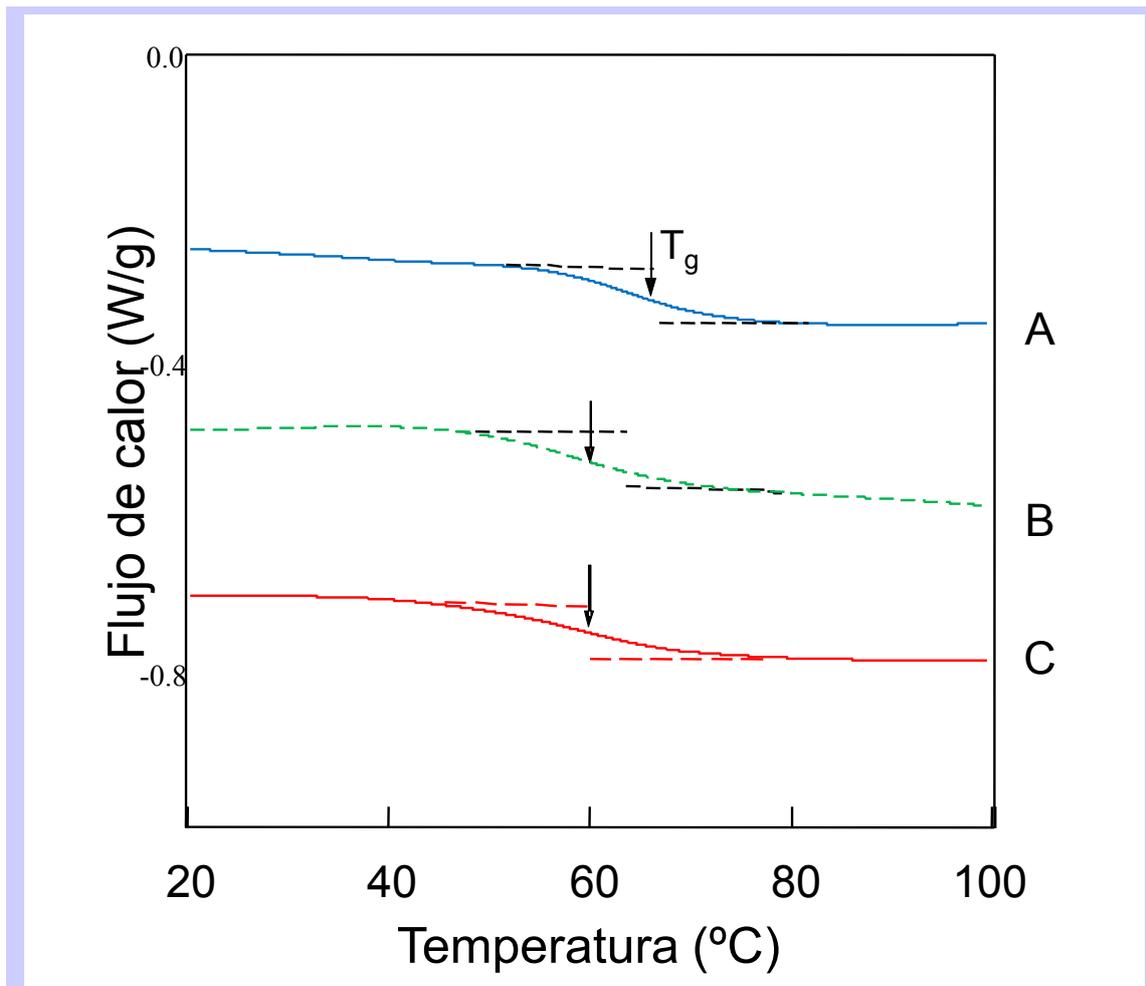
En todos los casos se observó una pendiente abrupta y pequeñas caídas de la fuerza (rupturas parciales de la estructura) relacionadas con el quiebre (o la ruptura) característico de materiales crocantes (Hofsets & Lopes, 2005; Varela *et al.*, 2006; Vincent, 1998) (Figura 4.12).

Luego de 120 días de almacenamiento, los *snacks* cargados con bacterias mostraron colapso de la estructura debido a la adsorción de agua a lo largo del almacenamiento, lo cual se evidenció con una menor pendiente, y una mayor deformación. No se evidenció un patrón de irregular, resultante de rupturas parciales previas a la ruptura. Por el contrario, debido al efecto plastificante del agua, se observó un patrón típico de un material dúctil.

En los *snacks* recubiertos se observaron valores mayores para el índice de *browning* respecto del *snack* control. Estos cambios podrían deberse al tratamiento térmico adicional (60 °C durante 50 min) necesario para el secado del recubrimiento sobre el *snack* (Figura 4.10). Sin embargo, teniendo en cuenta el efecto protector frente al pardeamiento del tejido de manzana informado para la isomalt (Tavera-Quiroz *et. al*, 2014), podría pensarse que el aumento del índice de *browning* podría haber sido aún mayor sin la adición de isomalt.

#### 4.II.4.4 Propiedades estructurales y térmicas de los *snacks*

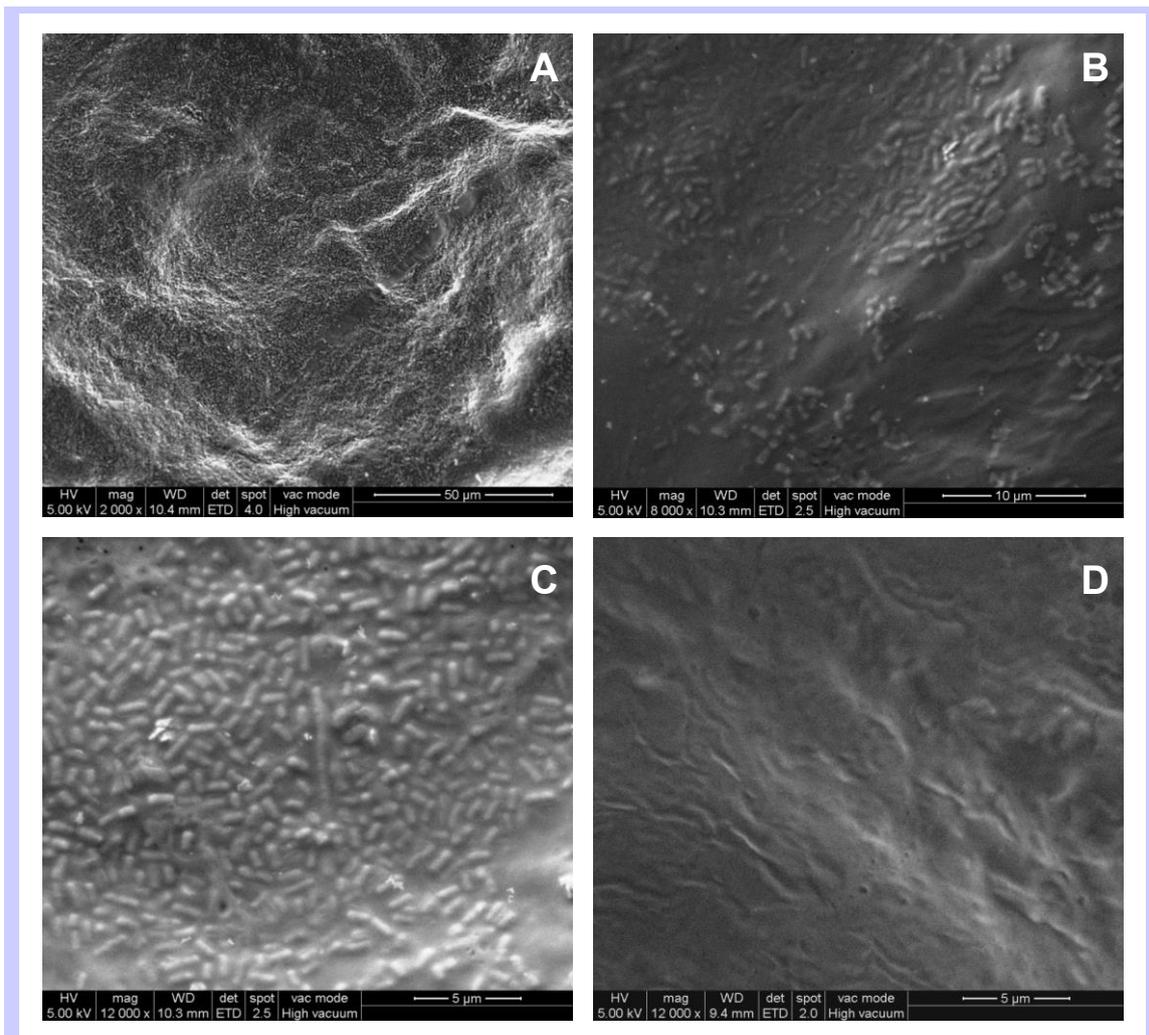
La temperatura de transición vítrea de los *snacks* se determinó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Para los *snacks* sin recubrimiento (control) se obtuvieron valores de  $T_g$  de 68 °C (Figura 4.13 curva A), mientras que los *snacks* recubiertos con metilcelulosa y *L. plantarum* CIDCA 83114 presentaron valores de alrededor de 58 °C (Figura 4.13 curva B). Luego de 90 días de almacenamiento, la  $T_g$  de los *snacks* recubiertos descendió a 57 °C (Figura 4.13 curva C) y no se observaron diferencias significativas con respecto al valor obtenido al tiempo inicial ( $p > 0.05$ ). Aunque el valor de  $T_g$  en los *snacks* recubiertos muestra un descenso con respecto al control, el mismo continúa siendo muy superior a 20 °C, que fue la temperatura seleccionada para el almacenamiento. A esta temperatura la diferencia  $|T - T_g|$  es suficiente para garantizar el estado vítreo del producto. Estos resultados fueron consistentes con el contenido de humedad, considerando que el control presentó el menor valor de humedad (1.8 % b.s) y la mayor  $T_g$  (Tabla 4.3).



**Figura 4.13.** Termogramas DSC de los *snacks* de manzana recubiertos con películas de metilcelulosa cargadas con *L. plantarum* CIDCA 83114. Los *snacks* fueron almacenados a 20 °C y 60 % HR. *Snack* sin recubrimiento (control, A), *snack* recubierto con películas de metilcelulosa y bacterias antes (B) y después de 90 días (C) de almacenamiento. La temperatura de transición vítrea se obtuvo a partir del segundo barrido. Las flechas indican el punto de inflexión de la T<sub>g</sub>.

#### 4.II.4.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM) del *snack* funcionalizado

La Figura 4.14 muestra las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido de la superficie de los *snacks* de manzana recubiertos con las películas de metilcelulosa cargadas con *L. plantarum* CIDCA 83114 (Figura 4.14A, B y C) y de los *snacks* de manzana sin recubrimiento (control) (Figura 4.14D). En las imágenes obtenidas se observan los microorganismos inmovilizados en las películas de metilcelulosa que recubren al *snack*, sin alteraciones morfológicas evidentes.

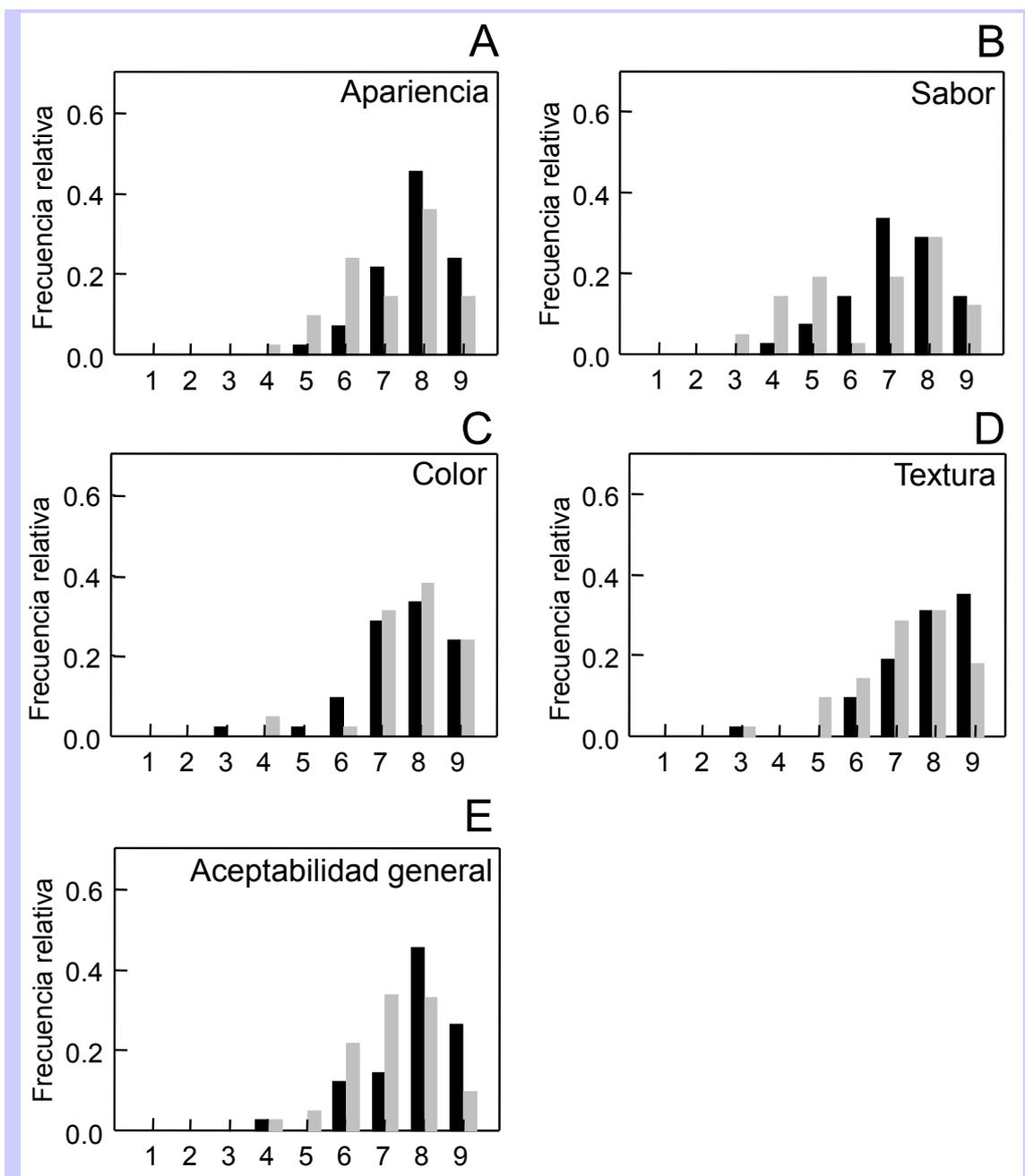


**Figura 4.14.** Microscopía electrónica de barrido de los *snacks* de manzana recubiertos con películas de metilcelulosa cargadas con *L. plantarum* CIDCA 83114 a diferentes resoluciones (A, B y C) y del *snack* sin recubrimiento (control, D). Las barras de escala se indican al pie de las imágenes.

#### 4.II.4.6 Panel Sensorial

Se evaluó la aceptabilidad de los *snacks* recubiertos con microorganismos mediante un panel sensorial. Los panelistas evaluaron los parámetros de apariencia, color, textura, sabor y aceptabilidad global, en una escala de 1 (disgusta extremadamente) a 9 (gusta extremadamente). La Figura 4.15 muestra la frecuencia relativa, que corresponde al número de veces que los panelistas otorgaron un puntaje para cada atributo sobre el número total de panelistas (50).

Para los diferentes parámetros, la máxima frecuencia relativa de las respuestas estuvo entre 7 y 8 para los *snacks* con recubrimiento, bien por encima del valor de 5 que es el umbral mínimo de aceptabilidad.



**Figura 4.15.** Evaluación sensorial de los *snacks* de manzana: **A.** apariencia; **B.** sabor; **C.** color; **D.** textura; **E.** aceptabilidad general. Frecuencia: número de panelistas que eligieron una categoría sobre el total de panelistas (50). Categoría: Desde 1 (disgusta extremadamente) a 9 (gusta extremadamente). *Snacks* recubiertos con *L. plantarum* CIDCA 83114 (barras grises). *Snack* sin recubrimiento (control) (barras negras).

La puntuación para el sabor del *snack* recubierto con los microorganismos inmovilizados en la película de metilcelulosa fue similar ( $p > 0.05$ ) a la obtenida por el *snack* control (sin el recubrimiento) ( $6.5 \pm 1.9$  y  $7.2 \pm 1.2$ , respectivamente, indicando que la adición del recubrimiento con bacterias lácticas no alteró este atributo. En relación al atributo de color, los panelistas dieron una puntuación

superior al *snack* con recubrimiento ( $7.7\pm 1.2$ ) en comparación con el control ( $7.4\pm 1.3$ ), no obstante este valor no fue estadísticamente significativo ( $p>0.05$ ). Esta leve diferencia en el color puede ser atribuida a que el tiempo más prolongado de secado ( $140\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ min}$  y  $60\text{ }^{\circ}\text{C}/50\text{ min}$ , permitió un mayor desarrollo de la reacción de caramelización, lo que dio lugar a valores más altos del índice *browning* (Tabla 4.3). En lo que se refiere a la textura, si bien no se observaron diferencias significativas para este atributo ( $p>0.05$ ), los panelistas dieron una puntuación ligeramente inferior a los *snacks* con recubrimiento ( $7.9\pm 1.1$  y  $7.2\pm 1.3$ , para el control y *snack* recubierto, respectivamente), probablemente debido al mayor valor de la humedad de la muestras. Sin embargo, los perfiles de textura, obtenidos instrumentalmente, siguieron una tendencia similar en los dos *snacks* sin presentar diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Los resultados obtenidos para la aceptabilidad general tampoco mostraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ), y fueron de  $7.8\pm 1.0$  para el control y  $7.2\pm 1.3$  para el *snack* con recubrimiento.

Los resultados presentados demuestran que el recubrimiento de *snacks* de manzana con microorganismos potencialmente probióticos inmovilizados en películas de metilcelulosa no altera sus propiedades organolépticas significativamente. Esto es de gran importancia teniendo en cuenta el valor agregado que tiene este tipo de producto.



## CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta el aumento sostenido del consumo de *snacks* por parte de la población, se decidió formular un *snack* de manzana funcionalizado con bacterias lácticas potencialmente probióticas y FOS, e incluir en la formulación otros ingredientes saludables como isomalt, calcio y ácido ascórbico.

La incorporación de microorganismos para obtener alimentos funcionales representa un desafío debido a diferentes factores potencialmente perjudiciales. Entre ellos, las condiciones de producción y procesamiento, el almacenamiento y el pasaje a través del tracto gastrointestinal son los más relevantes. Las condiciones definidas en este capítulo permitieron sortear estos efectos nocivos y obtener *snacks* con una alta concentración de microorganismos viables.

De hecho, es destacable que la viabilidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 fue alrededor de  $10^6$  UFC/g luego de 90 días de almacenamiento seguido de la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas. Estos valores aseguran que la ingestión de alrededor de 25 g de *snacks* permite alcanzar una concentración bacteriana por encima de la recomendada por organizaciones como la CONAL (Codigo Alimentario Argentino art. 1389, 2011), la EFSA o la FDA para productos considerados probióticos al momento de la ingestión.

Teniendo en cuenta que se trata de un producto alimenticio, la aceptabilidad por parte del consumidor es crítica. En efecto, el *snack* desarrollado presentó propiedades reológicas (crocancia y textura) y organolépticas (sabor y color) adecuados. En su conjunto, dichos atributos contribuyeron

a una alta aceptabilidad del producto desarrollado por parte de un panel de personas entrenadas en la degustación de este tipo de alimentos.

En resumen, el *snack* simbiótico desarrollado en este capítulo representa una opción saludable y sumamente valiosa para el *delivery* de bacterias lácticas y prebióticos en matrices alimenticias no lácteas.

DISCUSIÓN GENERAL

Y

ANEXOS

## DISCUSIÓN GENERAL

Las bacterias lácticas juegan un papel importante en la salud y el bienestar humano y animal, y su empleo en la preparación y conservación de alimentos data de tiempos antiguos. Es por ello que en la actualidad son los microorganismos más ampliamente usados en la industria de los alimentos (Albano *et al.*, 2009; Gerez, Torino, Rollán & Font de Valdez, 2009; Giraffa, Chanishvili & Widyastuti, 2010). Su rol principal en los procesos de fermentación es la producción de componentes activos que generan cambios en la textura, pH, características organolépticas y de durabilidad de los alimentos y bebidas fermentados. Por otro lado, desde que hace más de un siglo, Metchnikoff (1908) propusiera que el consumo de microorganismos vivos benéficos podría desplazar organismos putrefactivos y patogénicos del intestino y aumentar la longevidad, se han sucedido numerosos avances en el conocimiento del impacto del consumo de microorganismos probióticos sobre la microbiota intestinal y su efecto benéfico en la salud humana, los cuales han dado un gran impulso al desarrollo de nuevos alimentos. En dichos alimentos, la valoración del rol de las bacterias lácticas va más allá de su acción primaria sobre el alimento, considerándose ahora sus efectos beneficiosos sobre la promoción de la salud. Considerando la relevancia de las bacterias lácticas tanto en la producción de alimentos como en la promoción de la salud, el estudio de la preservación de estos microorganismos para su aplicación en alimentos funcionales o como agentes terapéuticos resulta de suma relevancia para la industria de los alimentos y la farmacéutica.

Este contexto alentó el desarrollo de este trabajo de tesis. En él se abordó el estudio de los fructo-oligosacáridos (FOS) como agentes preservadores de la viabilidad de lactobacilos sometidos a distintos tipos de procesos de conservación en diferentes matrices. El estudio abarcó los diferentes procesos desde la optimización de la síntesis del agente protector hasta su utilización en la formulación de un nuevo alimento conteniendo microorganismos vivos.

Los FOS se encuentran naturalmente en vegetales como la cebolla, la achicoria, el ajo y el espárrago, entre otros. También pueden ser obtenidos a partir de la hidrólisis de inulina o mediante síntesis enzimática a partir de sacarosa. Luego de su ingestión, los FOS no son hidrolizados por las glucosidasas del intestino delgado y alcanzan el colon estructuralmente sin cambios. Allí, son metabolizados por la microflora intestinal para formar ácidos carboxílicos de cadena corta, L-lactato, CO<sub>2</sub>, hidrógeno y otros metabolitos, ejerciendo un efecto prebiótico sobre la microbiota. Estos efectos benéficos han estimulado la incorporación de FOS en los productos alimenticios y en fórmulas infantiles (Sabater-Molina *et al.*, 2009). Si bien el efecto prebiótico de los FOS ha sido ampliamente investigado, su capacidad protectora durante procesos de deshidratación de bacterias ácido lácticas ha sido escasamente explorada.

En el primer capítulo se estudió la síntesis de FOS a partir de sacarosa y el efecto de la concentración de sustrato en los productos obtenidos. La síntesis enzimática de FOS a partir de sacarosa representa una alternativa atractiva para la producción de prebióticos. Desde el punto de vista de la sustentabilidad, la sacarosa es un sustrato de bajo costo y fácil acceso en Argentina. Además, se trata de un proceso de síntesis de bajo impacto ecológico, ya que no se emplearon productos químicos contaminantes. Adicionalmente, es importante tener en cuenta la situación del mercado del sector azucarero en Argentina y en el mundo (Informe de cadenas de valor, Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas, Julio de 2016, ISSN 2525-0221). En los últimos años se observó una caída del precio internacional de la sacarosa, que pasó de un pico de US\$ 770 la tonelada en 2011 a US\$ 388 a principios de 2016. Por otro lado, se estima que el consumo del mercado interno crece a una tasa vegetativa, es decir muy lentamente. En simultáneo, existen tendencias a la sustitución del azúcar por otros edulcorantes. Argentina es un productor importante de sacarosa a nivel mundial, y a pesar de que su producción anual de sacarosa (2 millones de toneladas métricas valor crudo, TMVC, durante la campaña 2016) (Informe de cadenas de valor, Julio de 2016, SSN 2525-0221), es bastante mayor que su consumo interno (1.8 millones de TMVC promedio entre las campañas 2009/2010 y 2014/2015), el excedente no se utiliza para sostener una producción nacional de prebióticos a nivel industrial, por lo que el país continúa siendo un importador neto de prebióticos.

En este contexto, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis adquieren una especial relevancia porque aportan herramientas fundamentales para una futura transferencia a la industria que permita otorgar un valor agregado a la sacarosa.

En la realización de este trabajo de tesis se planteó un enfoque integral sobre los fructo-oligosacáridos, en primera instancia se analizó su síntesis a partir de sacarosa, considerando la modulación de la composición de los oligosacáridos obtenidos y el desarrollo de un método de monitoreo práctico y novedoso mediante espectroscopía FTIR y análisis multivariante. Los resultados obtenidos, presentados en el capítulo I, muestran que la composición de los FOS sintetizados a partir de sacarosa está fuertemente determinada por la concentración inicial de sacarosa utilizada en la síntesis. La modulación de la composición de las mezclas de FOS de manera controlada a través de cambios en las condiciones de síntesis, representa un enfoque más realístico para la obtención de prebióticos con características protectoras definidas, ya que la purificación de los componentes de síntesis resulta poco práctico y difícil de llevar a cabo a escala industrial. Por su parte, los modelos PLS calibrados y validados constituyen una herramienta sumamente valiosa para determinar la composición de FOS en muestras desconocidas. Esta ventaja tecnológica no se limita solamente al seguimiento de la reacción enzimática sino que también adquiere especial importancia para el control de calidad de la producción industrial de FOS. Si bien el uso de métodos multivariante ha ido incrementándose en los últimos 10-15 años gracias al desarrollo de capacidades computacionales adecuadas, sus potencialidades aún no son bien aprovechadas debido en gran medida a su desconocimiento. El uso combinado de métodos espectroscópicos y análisis multivariante representa una enorme ventaja, especialmente cuando se deben analizar muchas muestras con estructuras complejas.

Los resultados presentados en el capítulo II permitieron arrojar luz sobre los mecanismos involucrados en la protección que brindan los diferentes componentes de una mezcla de FOS durante la liofilización y posterior almacenamiento de las bacterias deshidratadas, usando como modelo la cepa altamente sensible *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333. Se demostró claramente la complementariedad de las dos hipótesis de conservación: los azúcares más pequeños resultaron más eficientes en la protección de las membranas lipídicas, y los de mayor peso molecular presentaron mejores propiedades de vitrificación. Estos resultados se correlacionan con lo informado por otros autores para el efecto protector de algunos FOS sobre membranas modelo (liposomas) (Ozaki *et al.*, 1996 y Demel *et al.*, 1998) (Vereyken *et al.*, 2001; Huijbregts, 2000; Hinch *et al.*, 2007; Vijn *et al.*, 1999). De acuerdo a nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se racionaliza el efecto de los componentes de mezclas de FOS sobre la protección de bacterias lácticas deshidratadas.

La magnitud del mercado mundial de *starters* a base de bacterias lácticas (Santivarangkna *et al.*, 2007) resalta la importancia de contar con métodos adecuados de preservación, que permitan obtener una elevada tasa de supervivencia de los microorganismos en tiempos cortos y con bajos costos energéticos. En el capítulo III se presentaron los resultados de los experimentos realizados durante una estadía de trabajo en la Cátedra de Ingeniería de Procesos Alimentarios y Tecnología Láctea (Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie) de la Technische Universität München (Alemania), en la cual se estudió el efecto de una mezcla de FOS comerciales en la preservación de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 mediante microondas y vacío, a escala piloto. El secado por microondas y vacío representa una solución innovadora para reducir los tiempos de secado, y concomitantemente los costos energéticos, requeridos por el secado en vacío. Esta metodología de secado demostró ser una alternativa práctica y eficiente para la deshidratación de la cepa altamente sensible *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333, lo que pone de manifiesto su potencial en la preservación de *starters* de interés industrial. El secado por microondas y vacío ya había sido utilizado para la deshidratación en procesos farmacéuticos, procesamiento de muestras histoquímicas, etc. (Scaman & Durance, 2005). Sin embargo, su empleo en la preservación de bacterias lácticas ha sido muy escasamente investigado (Kim *et al.*, 1995; Ahmad *et al.*, 2007 y 2012; Ambros *et al.*, 2016), lo que resalta el valor de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis.

Como aplicación de los FOS estudiados a lo largo de este trabajo de tesis se desarrollaron películas de metilcelulosa suplementadas con FOS como vehículo para dos cepas de lactobacilos. Para el estudio de dichas películas se utilizó un enfoque integrador que incluyó tanto la caracterización fisicoquímica de las películas como la estabilidad de los microorganismos inmovilizados en las mismas.

La cantidad de bacterias supervivientes por gramo de película fue superior a la recomendada por los organismos nacionales, como el INAL y ANMAT (Código Alimentario Argentino art. 1839; Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011) e internacionales como la EFSA y la FDA (Aquilina *et al.*, 2013; Hill *et al.*, 2014.; Phuapaiboon *et al.*, 2013.; Tripathi & Giri, 2014) para ser considerada un vehículo válido de administración de probióticos. Los resultados obtenidos muestran que las películas desarrolladas constituyen una estrategia simple y económica para inmovilizar y almacenar bacterias lácticas de interés industrial y sustentan potenciales aplicaciones de los microorganismos inmovilizados en el desarrollo de alimentos funcionales deshidratados que contengan probióticos y prebióticos.

En la parte final de este trabajo de tesis se funcionalizó un *snack* de manzana deshidratado con *L. plantarum* CIDCA 83114 inmovilizado en películas de metilcelulosa. Los resultados presentados

demonstraron que el recubrimiento de *snacks* de manzana con microorganismos potencialmente probióticos inmovilizados en películas de metilcelulosa no alteró sus propiedades sensoriales, y los microorganismos mantuvieron su viabilidad luego de 90 días de almacenamiento y exposición a condiciones gastrointestinales simuladas. Estos valores aseguran que la ingestión de alrededor de 25 g de *snacks* permite alcanzar una concentración bacteriana por encima de la recomendada por organizaciones como la CONAL (Codigo Alimentario Argentino art. 1389, 2011), la EFSA o la FDA para productos considerados probióticos al momento de la ingestión. El producto obtenido representa una alternativa atractiva a los tradicionales productos simbióticos de base láctea y sustenta el empleo de las películas de metilcelulosa con probióticos y prebióticos inmovilizados como vehículos adecuados para la funcionalización de alimentos deshidratados.

En resumen, las actividades experimentales desarrolladas a lo largo del presente plan de tesis doctoral han permitido:

- Establecer condiciones de síntesis para obtener mezclas de FOS de composición definida a partir de un sustrato de bajo costo, definir métodos analíticos para identificar y cuantificar los componentes de dichas mezclas y desarrollar sistemas de separación para purificarlas.
- Caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en la actividad de hidratos de carbono de distinto grado de polimerización en la protección de los lactobacilos durante la deshidratación y el almacenamiento.
- Utilizar una tecnología novedosa, como el secado en microondas y vacío, para la producción a escala piloto de *starters* de bacterias lácticas sensibles, protegidos con FOS.
- Desarrollar un método de inmovilización de lactobacilos en películas de metilcelulosa utilizando los FOS como agentes protectores, y utilizar estas películas para recubrir rodajas de manzanas horneadas, logrando un producto tipo *snack* saludable, de muy buenas características organolépticas, funcionalizado con cantidades elevadas de bacterias probióticas vivas, en una matriz que las protege durante el almacenamiento y la digestión gastrointestinal.

Como corolario de este trabajo, que incluyó una primera etapa de exploración básica y concluyó con un desarrollo aplicado, se obtuvo una patente de invención [**Producto alimenticio funcionalizado con probioticos y prebioticos y método para su preparación**" (en trámite) Instituto Nacional de la Propiedad Intelectual (INPI); Acta. P20150102508], lo que representa a nuestro entender un aporte relevante a la vinculación de la ciencia y la tecnología con la industria en nuestro país.



# ANEXOS

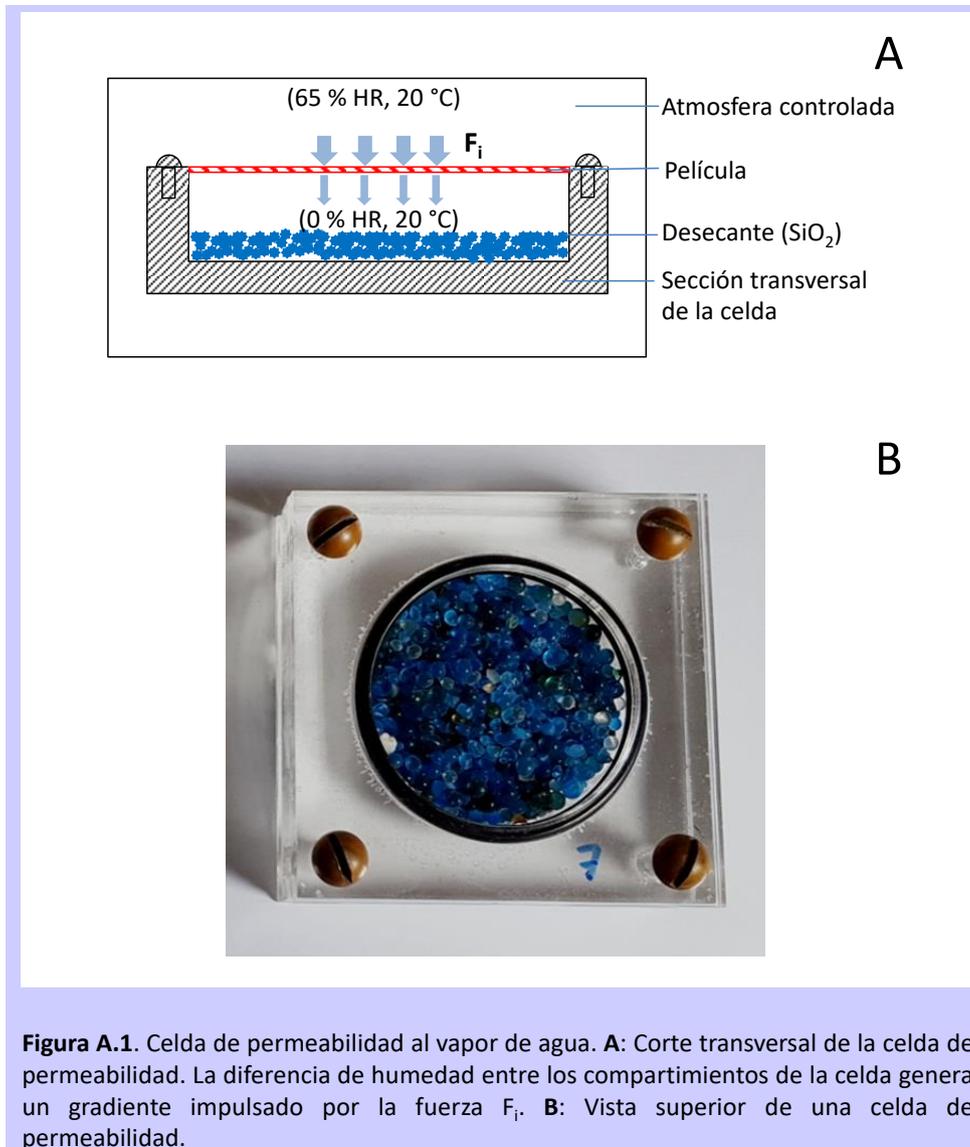
## Anexo A.1. Permeabilidad al vapor de agua de las películas

La permeabilidad al vapor de agua se conoce como la cantidad de vapor (g) que pasa a través de un material de espesor conocido (mm) por unidad de superficie ( $m^2$ ) y por unidad de tiempo (s) cuando entre sus paredes existe una diferencia de presión unitaria (Pa).

En este trabajo de tesis, la permeabilidad al vapor de agua se midió usando el método sugerido por la ASTM [*American Society for Testing Materials* (ASTM), ASTM E 96, 1995] con algunas modificaciones. El método se basa en que la diferencia de presión parcial de vapor de agua existente a ambos lados de la película proporciona una fuerza impulsora ( $F_i$ ) para el flujo de vapor a través de la misma (Figura .A.1).

Una vez alcanzado el estado estacionario se registran los cambios de peso de la celda en función del tiempo, el cociente entre el peso para un tiempo dado y el área de la película, definida como la ganancia de peso (GW,  $g/m^2$ ). La pendiente de la recta obtenida al graficar la ganancia de peso de la celda en función del tiempo se conoce como la **tasa de transmisión de vapor de agua** (WVTR,  $g/sm^2$ ). La **permeancia** es el valor obtenido partir del cociente de WVTR y el gradiente de presión parcial de vapor ( $\Delta P$ ) a través de la película. Este último valor corresponde al gradiente generado por una humedad relativa (HR) de 65% a un lado de la película y dióxido de silicio ( $SiO_2$ ), de 0% HR, al otro lado (1753.55 Pa a 20°C, dato obtenido de tablas de propiedades termodinámicas). Finalmente,

la **permeabilidad al vapor de agua** (WVP) se obtiene como el producto entre la permeancia y el espesor de la película (WVP, g/Pa s m).



## Anexo A.2. Ensayos dinámicos

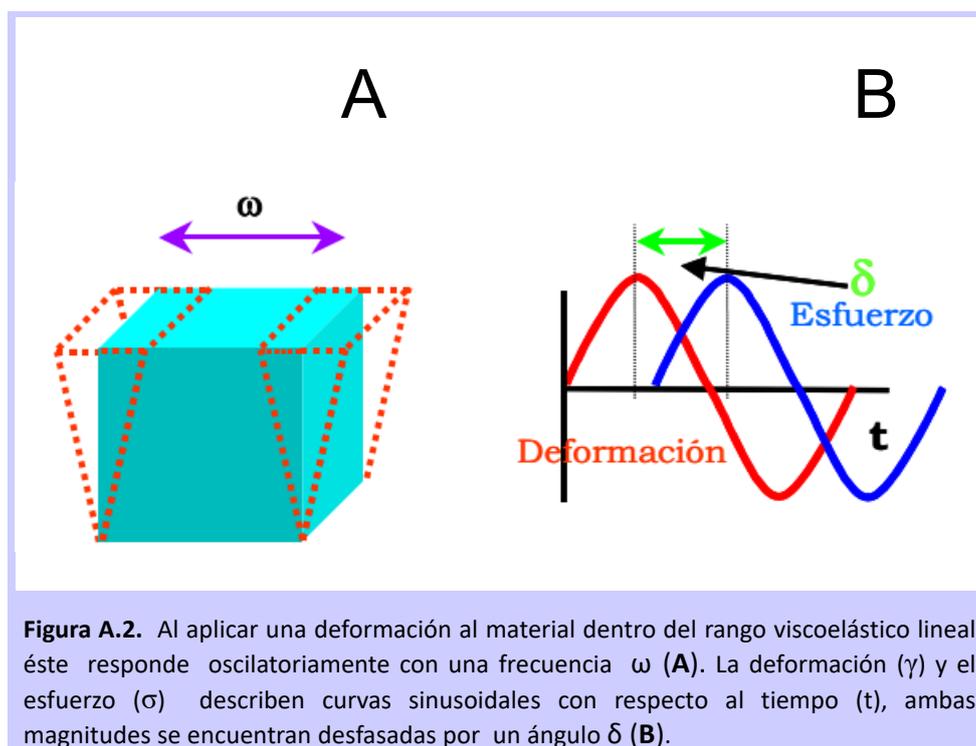
Las medidas mecánico-dinámicas u oscilatorias permiten caracterizar las propiedades viscosas y elásticas de un material. Los ensayos dinámicos se realizan a deformaciones muy bajas, de modo que se mantenga una relación lineal entre el esfuerzo ( $\sigma$ ) y la deformación ( $\gamma$ ), denominándose esta zona como de "viscoelasticidad lineal". Para la determinación de la zona de viscoelasticidad lineal se realizan ensayos de barrido de frecuencia ( $\omega$ ) en los cuales se mantiene la amplitud de la oscilación y la temperatura constante y barridos de esfuerzo en los cuales se varía la amplitud de la oscilación pero a frecuencia constante.

En este tipo de experimentos la deformación aplicada varía sinusoidalmente (Figura A2.A y B) con el tiempo ( $t$ ) de acuerdo con la expresión:

$$\gamma = \gamma^0 \text{sen } \omega t \quad (\text{Ec. A.1})$$

mientras que el esfuerzo de cizalla varía con la misma frecuencia  $\omega$ , pero presentando un desfase  $\delta$  con respecto a la deformación (Figura A2.B):

$$\sigma = \sigma^0 \text{sen } (\omega t + \delta) \quad (\text{Ec. A.2})$$



Teniendo en cuenta las ecuaciones que describen el comportamiento de la deformación y el esfuerzo (Ec. A.1 y A.2), es posible desarrollar la ecuación constitutiva hasta llegar a la expresión:

$$\sigma = \gamma^0 (E' \text{sen } \omega t + E'' \text{cos } \omega t) \quad (\text{Ec. A.3})$$

definiendo el módulo de almacenamiento o módulo elástico  $E'(\omega)$  y el módulo de pérdidas o módulo viscoso  $E''(\omega)$ . El módulo elástico está asociado con la energía almacenada en el material mientras que el módulo viscoso, se asocia con la energía disipada por el material.

Los módulos elástico y viscoso se relacionan mediante la  $\tan \delta$ :

$$\tan \delta = E''/ E' \quad (\text{Ec. A.4})$$

donde  $\delta$  representa el desfase existente entre el esfuerzo y la deformación, siendo un parámetro indicativo de la relación entre la energía disipada y la almacenada por el material y de la viscoelasticidad del mismo.

- Si es un material elástico el esfuerzo y la deformación están en fase y  $\delta \approx 0^\circ$ .
- Si el material es viscoso entonces el esfuerzo y la deformación están en desfase y  $\delta \approx 90^\circ$ .
- Si es un material viscoelástico  $\delta$  tendrá valores entre 0 y  $90^\circ$ .

### **Análisis Mecánico Dinámico**

La técnica de análisis dinámico-mecánico, DMA, permite estudiar las propiedades viscoelásticas de los materiales. El DMA es una de las técnicas de análisis térmico utilizada para estudiar la influencia de la estructura molecular sobre las propiedades físicas de los materiales, permitiendo obtener información sobre la  $T_g$ . Además, se caracteriza por su sensibilidad para detectar cambios en la movilidad interna molecular no detectables mediante otras técnicas de análisis térmico. Si bien la  $T_g$  puede determinarse a través de DSC, la técnica de DMA también es apropiada y brinda información más completa, dado que permite analizar las contribuciones de las distintas fases o componentes.

En los ensayos de DMA, la muestra es sometida a un esfuerzo en forma de torque, flexión o tensión, de amplitud pequeña, que varía sinusoidalmente en función del tiempo. Si el material es perfectamente elástico, toda la energía mecánica que se le aplique se transformará en energía potencial, que posteriormente será recuperada. Por el contrario, si el material se comporta como un líquido, la energía no se almacenará, y será disipada en forma de calor.

En un material viscoelástico ambos comportamientos están presentes, y al aplicar un esfuerzo sinusoidal, la deformación resultante será también sinusoidal (si el esfuerzo es suficientemente pequeño como para que el comportamiento sea lineal) pero estará desfasada respecto del esfuerzo. Este desfase es consecuencia del tiempo necesario para que ocurra la reorganización molecular y se relaciona con los fenómenos de relajación. A la temperatura y frecuencia a la que el material sufre una relajación, la componente real del módulo de almacenamiento ( $E'$ ) disminuye

abruptamente y el módulo de pérdida ( $E''$ ) presenta un máximo. La  $\tan \delta$ , definida como  $E''/E'$ , representa el desfase entre el esfuerzo y la deformación. Estos valores atraviesan un máximo a temperaturas superiores al módulo de pérdida.

### Anexo A.3. Análisis de textura

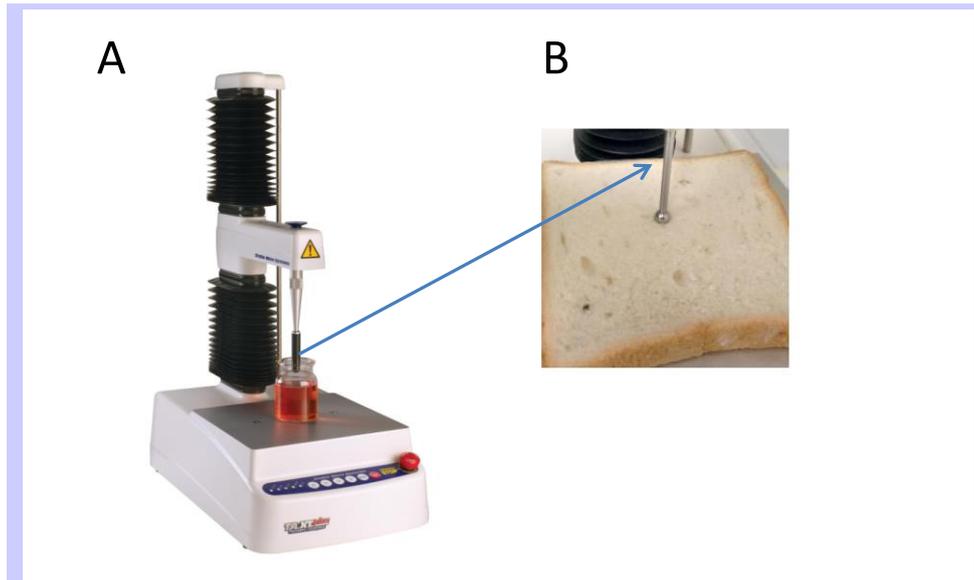
La **textura** involucra todos los atributos reológicos y estructurales (geométricos y de superficie) de un alimento, que son perceptibles por medio de receptores mecánicos, táctiles y, cuando corresponde, visuales y auditivos. La evaluación **objetiva** de la textura es compleja pues ella debe reflejar la acción de la boca al remover el alimento del tenedor o la cuchara, la acción de la lengua y mandíbulas al mover el alimento y la acción de los dientes al cortar, romper, extender, moler y succionar los alimentos.

Las **características texturales** usualmente evaluadas en los alimentos incluyen las **propiedades mecánicas** de dureza, cohesividad, adhesividad, fracturabilidad, consistencia, gomosidad y elasticidad, así como **parámetros geométricos, de superficie y de composición** (e.g., contenido de grasa, tenor de humedad).

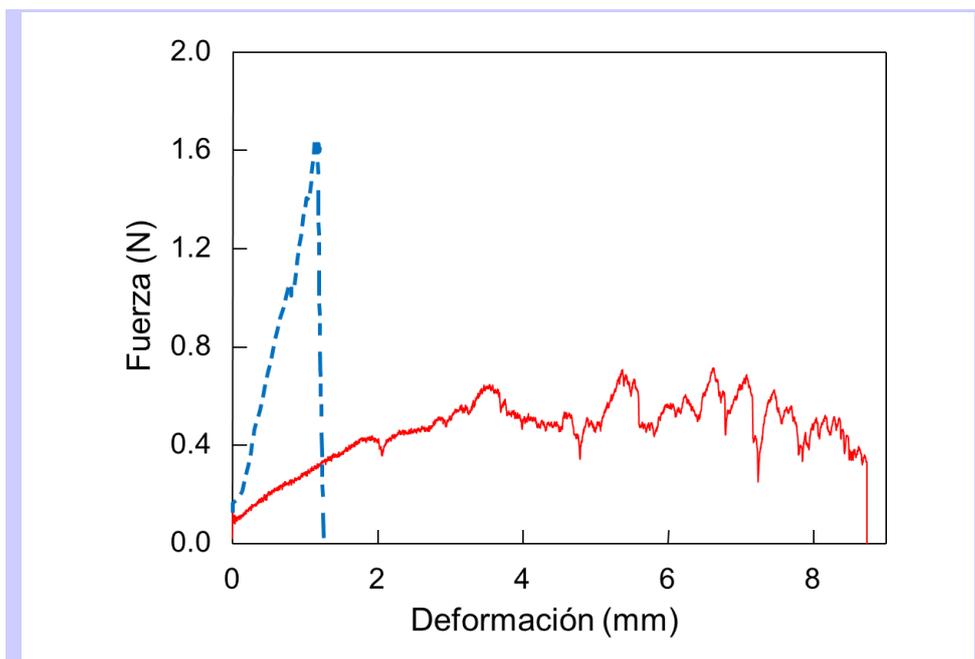
Existen numerosas **formas de evaluar la textura** de los alimentos. Los ensayos de gran deformación y las propiedades de fractura de alimentos sólidos y semisólidos son muy importantes para la evaluación de su respuesta al procesamiento, manipuleo, almacenamiento, uso y respuesta durante el consumo. Muchos de los ensayos usados involucran el someter al material a esfuerzos, lo cual determina una deformación que se mide, o bien deformar controladamente el material y evaluar el esfuerzo requerido. Entre los aparatos más comúnmente usados para estos ensayos se encuentran los texturómetros (Figura A.3).

#### Parámetros texturales relevantes en el estudio de alimentos deshidratados

Los productos crujientes se caracterizan por una textura rígida a la flexión que se rompe rápidamente una vez que se alcanza la "fuerza de fractura". En los ensayos realizados con un texturómetro, se aprecia un rápido incremento de la fuerza hasta un punto máximo donde se fractura el material y la fuerza disminuye inmediatamente después de este punto, lo cual denota características crujientes en los productos. Sin embargo, si el producto no es crujiente, se observa una región de deformación elástica y la ruptura ocurre lentamente (Figura A.4)



**Figura A.3.** A. Equipo para el análisis de textura. Un brazo mecánico sensa esfuerzos y deformaciones a medida que se desplaza sobre el material a ensayar. De acuerdo al material ensayado seleccionará un tipo particular de sonda. B. Sonda semiesférica de penetración comprimiendo una rodaja de pan.



**Figura A.4** Perfiles típicos de textura (esfuerzo vs deformación) de un material frágil (curva de guiones; color azul) y un material dúctil (curva continua; color rojo).

A partir de los perfiles de textura se puede caracterizar un alimento considerando los siguientes parámetros:

**Esfuerzo a la ruptura ( $\sigma_r$ ):** Es el máximo esfuerzo que el espécimen soporta durante el test antes de la ruptura.

**Deformación a la ruptura ( $\epsilon_r$ ):** Es la deformación porcentual en el punto de ruptura de la muestra.

**Módulo de Young (E):** Para muchos materiales se observa que en la porción inicial del test la relación entre el esfuerzo y la deformación del espécimen muestra un comportamiento lineal que cumple con la Ley de Hooke. La pendiente en esta región donde el esfuerzo es proporcional a la deformación se conoce como Módulo elástico o de Young:

$$E = \sigma / \epsilon \quad (E\chi. A.5)$$

#### Anexo A.4. Análisis de color

El color superficial de las muestras se determinó con un colorímetro Minolta CR-400 Series (Osaka, Japón). La fuente de luz en el equipo garantiza una iluminación uniforme del producto para todas las mediciones. El "observador" del colorímetro es un conjunto de tres fotocélulas filtradas para coincidir exactamente con las funciones del observador estándar, por lo que las condiciones son uniformes para todas las mediciones. Generalmente se utiliza la escala CIELab (Comission International de L' Eclairage) cuyos parámetros son definidos como luminosidad ( $L^*$ ) donde 0 es negro y 100 es blanco y los parámetros de cromaticidad  $a^*$  (rojo - verde) y  $b^*$  (amarillo - azul). Como es sabido, los valores positivos de  $a^*$  son rojos y los negativos verdes y para  $b^*$  los valores positivos corresponden al color amarillo y los negativos al azul.

A partir de los parámetros obtenidos se calculó el índice de pardeamiento o Browning Index (BI). El índice BI se informa como un parámetro importante en procesos donde el pardeamiento enzimático o no enzimático ocurre, este parámetro relacionando los parámetros de color ( $a^*$ ,  $b^*$  y  $L^*$ ) (Guerrero *et al.*, 1996; Schebor *et al.*, 1999; Jalaee *et al.*, 2011). El BI se calculó a partir de la Ec. 4.3.



## REFERENCIAS

- Adlercreutz H. (1990) Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 50, 3-23.
- Ahmad S., Yaghmaee P., Durance T.D. (2007) Survival of probiotic bacteria and food yeast dehydrated with microwave energy under vacuum. *41st Annual Microwave Symposium Proceedings*. 30-34.
- Ahmad S., Yaghmaee P., Durance T.D. (2012) Optimization of Dehydration of *Lactobacillus salivarius* using radiant energy vacuum. *Food and Bioprocess Technology*. 5, 1019-1027.
- Akhiar N.S.M. (2010) Enhancement of probiotics survival by microencapsulation with alginate and prebiotics. *Basic Biotechnology*. 6, 13-18.
- Albano H., Pinho C., Leite D., Barbosa J., Silva J., Carneiro L., Teixeira P. (2009) Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for "Alheira", a fermented meat sausage. *Food Control*. 20(8), 764–770.
- Allison S.D., Chang B., Randolph T.W., Carpenter J.F. (1999) Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 365, 289-298.
- Altamirano-Fortoul R., Moreno-Terrazas R., Quezada-Gallo A., Rosell C.M. (2012) Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. *Food Hydrocolloids*. 29, 166-174.
- Ambros S., Bauer S.A.W., Shylkina L., Foerst P., Kulozik U. (2016) Microwave-Vacuum Drying of Lactic Acid Bacteria: Influence of Process Parameters on Survival and Acidification Activity. *Food and Bioprocess Technology*. 9(11), 1901-1911.
- Ambros S., Bauer S.A.W., Kulozik U., Foerst P. (2012) The potential of the microwave-vacuum technique in drying of probiotic and starter cultures. *International Drying Symposium (IDS 2012)*, Xiamen, China, 11-15 November 2012.

- Ambros S., Foerst P., Kulozik U. (2013) Temperature controlled microwave vacuum drying as innovative drying technique: Influence of process and product parameters on the product quality of probiotics. 6th Nordic Drying Conference (NDC 2013), Copenhagen, Denmark, 5-7 June 2013.
- Anal A.K., Singh H. (2007) Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*. 18, 240-251.
- Ananta E., Volkert M., Knorr D. (2005) Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*. 15, 399-409.
- And C.I., Kailasapathy K. (2005) Effect of Co-encapsulation of Probiotics with Prebiotics on Increasing the Viability of Encapsulated Bacteria under In Vitro Acidic and Bile Salt Conditions and in Yogurt. *Journal of Food Science*. 70(1), M18-M23.
- Angiolillo L., Conte A., Faccia M., Zambrini A.V., Del Nobile M.A. (2014) A new method to produce synbiotic Fiordilatte cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 22, 180-187.
- Anjani K., Iyer C., Kailasapathy K. (2004) Survival of co-encapsulated complementary probiotics and prebiotics in yoghurt. *Milchwissenschaft*. 59, 396-399.
- Anjos O., Campos M.G., Ruiz P.C., Antunes, P. (2015) Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food Chemistry*, 169, 218-223.
- AOAC Official methods of analysis. 1980 Association of Official Analytical Chemists (13th ed), Washington, DC.
- Aquilina G., Bach A., Bampidis V., Bastos M.L., Flachowsky G., Gralak M.A., Hogstrand Ch., Leng L., López-Puente S., Martelli G., Mayo B., Renshaw D., Rychen G., Saarela M., Sejrson K., Van Beelen P., Wallace R.J., Westendorf J. (2013) Scientific Opinion on the safety and efficacy of Probiotic LACTINA® (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Streptococcus thermophilus* and *Enterococcus faecium*) for chickens for fattening and piglets. *EFSA Journal*. 11, 3170-3183.
- Arrizón J., Uriasá-Silvas J.E., Sandoval G., Mancilla-Margalli N.A., Gschaedler A.C., Morel S., Monsan P. (2013) Production and Bioactivity of Fructan-Type Oligosaccharides. *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*. 184-199.
- Avila-Reyes S.V., Garcia-Suarez F.J., Jiménez M.T., San Martín-Gonzalez M.F., Bello-Perez L.A. (2014) Protection of *Lactobacillus rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. *Carbohydrate Polymers*. 102, 423-430.
- Baum A., Meyer A.S., Garcia J.L., Egebo M., Hansen P.W., Mikkelsen J.D. (2013) Enzyme activity measurement via spectral evolution profiling and PARAFAC. *Analytica Chimica Acta*. 778, 1-8.
- Beck V., Jabůrek M., Demina T., Rupprecht A., Porter R.K., Ježek P., Pohl E.E. (2007) Polyunsaturated fatty acids activate human uncoupling proteins 1 and 2 in planar lipid bilayers. *FASEB Journal*. 21, 1137-1144.
- Bedani R., Vieira A.D.S., Rossi E.A., Saad S.M.I. (2014) Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. *LWT Food Science and Technology*. 55, 436-443.
- Beekes M., Lasch P., Naumann D. (2007) Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. *Veterinary Microbiology*. 123, 305-319.

- Bersaneti G.T., Mantovan J., Magri A., Mali S., Celligoi M.A.P.C. (2016) Edible films based on cassava starch and fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *Carbohydrate Polymers*. 151, 1132-1138.
- Betoret E., Betoret N., Arilla A., Bennár M., Barrera C., Codoñer P., Fito P. (2012) No invasive methodology to produce a probiotic low humid apple snack with potential effect against *Helicobacter pylori*. *Journal of Food Engineering*. 110(2), 289-293.
- Betoret N., Puente L., Díaz M., Pagán M., García M., Gras M., Martínez-Monzó J., Fito P. (2003) Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*. 56(2), 273-277.
- Bhadekar R., Parhi P. (2016) Non-dairy Functional Foods: Potential of Probiotics. *Microbes in Food and Health*. Ed. Springer. pp. 1-27.
- Bindels L.B., Neyrinck A.M., Salazar N., Taminiau B., Druart C., Muccioli G.G., Francois E., Blecker C., Richel A., Daube G. (2015) Non digestible oligosaccharides modulate the gut microbiota to control the development of leukemia and associated cachexia in mice. *PloS one*. 10(6), e0131009.
- Blanch M., Goñi O., Sanchez-Ballesta M.T., Escribano M.I., Merodio C. (2012) Characterisation and functionality of fructo-oligosaccharides affecting water status of strawberry fruit (*Fragaria vesca* cv. Mara de Bois) during postharvest storage. *Food Chemistry*. 134, 912-919.
- Blandino A., Al-Aseeri M., Pandiella S., Cantero D., Webb C. (2003) Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*. 36(6), 527-543.
- Bodvik R., Dedinaite A., Karlson L., Bergström M., Bäverbäck P., Pedersen J.S., Edwards K., Karlsson G., Varga I., Claesson P.M. (2010) Aggregation and network formation of aqueous methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 354, 162-171.
- Bomba A., Nemcová R., Gancarcíková S., Herich R., Guba P., Mudronová D. (2002) Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. *British Journal of Nutrition*. 88(S1), S95–S99.
- Boon M.A., Janssen A.E.M., van der Padt A. (1999) Modelling and parameter estimation of the enzymatic synthesis of oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Biotechnology and Bioengineering*. 64, 558-567.
- Brachkova M.I., Duarte A., Pinto J.F. (2009) Evaluation of the viability of *Lactobacillus* spp. after the production of different solid dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 98, 3329-3339.
- Brachkova M.I., Marques P., Rocha J., Sepodes B., Duarte M.A., Pinto J.F. (2011) Alginate films containing *Lactobacillus plantarum* as wound dressing for prevention of burn infection. *The Journal of Hospital Infection*. 79, 375-377.
- Brachkova M., Duarte A., Pinto J. (2012) Alginate films containing viable *Lactobacillus plantarum*: Preparation and in vitro evaluation. *AAPS PharmSciTech*. 13, 357-363.
- Bureau S., Ruiz D., Reich M., Gouble B., Bertrand D., Audergon J.M., Renard C.M.G.C. (2009) Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit. *Food Chemistry*. 115, 1133-1140.

- Burgain J., Gaiani C., Linder M., Scher J. (2011) Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 104, 467-483.
- Buriti F.C.A., Castro I.A., Saad S.M.I. (2010) Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 137, 121-129.
- Bustos P., Bórquez R. (2013) Influence of osmotic stress and encapsulating materials on the stability of autochthonous *Lactobacillus plantarum* after spray drying. *Drying Technology*. 31, 57-66.
- Cacela C., Hinch D.K. (2006) Monosaccharide composition, chain length and linkage type influence the interactions of oligosaccharides with dry phosphatidylcholine membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758, 680-691.
- Cámara-Martos F., Zurera-Cosano G., Moreno-Rojas R., García-Gimeno R.M., Pérez-Rodríguez F. (2012) Identification and quantification of lactic acid bacteria in a water-based matrix with near-infrared spectroscopy and multivariate regression modeling. *Food Analytical Methods*. 5(1), 19-28.
- Cammenga H.K., Zielasko B. (1996) Thermal behaviour of isomalt. *Thermochimica Acta*. 271, 149-153.
- Capela P., Hay T.K.C., Shah N.P. (2006) Effect of cryoprotectants, probiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*. 39, 203-211.
- Carasi P., Ambrosio N.M., De Antoni G.L., Bressollier P., Urdaci M.C., Serradell M. (2014) Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus. *Journal of Dairy Research*. 81, 16-23.
- Carasi P., Díaz M., Racedo S.M., De Antoni G.L., Urdaci, M.C., Serradell M.D.L.A. (2014) Safety Characterization and Antimicrobial Properties of Kefir-Isolated *Lactobacillus kefir*. *BioMed Research International* 2014. 208974.
- Carpenter J.F., Crowe J.H. (1989) An infrared spectroscopy study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry*. 28, 3916-3922.
- Carr F.J., Chill D., Maida N. (2002) The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(4), 281-370.
- Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P.M., Malcata F.X., Gibbs P. (2004) Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnology Progress*. 20, 248-254.
- Cervera A.E., Petersen N., Lantz A.E., Larsen A., Gernaey K.V. (2009) Application of near-infrared spectroscopy for monitoring and control of cell culture and fermentation. *Biotechnology progress*. 25, 1561-1581.
- Chaluvadi S., Hotchkiss Jr A.T., Call J.E., Luchansky J.B., Phillips J.G., Liu L.S., Yam K.L. (2012) Protection of probiotic bacteria in a synbiotic matrix following aerobic storage at 4 °C. *Beneficial Microbes*. 3, 175-187.
- Champagne C.P., Gardner N.J., Roy D. (2005) Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45, 61-84.
- Chávarri M., Marañón, I., Are, R., Ibáñez, F.C., Marzo F., Villarán M.d.C. (2010) Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 142, 185-189.

- Chen K.N., Chen M.J., Liu J.R., Lin C.W., Chiu H.Y. (2005) Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *Journal of Food Science*. 70, 260-266.
- Chen M., Mustapha A. (2012) Survival of freeze-dried microcapsules of  $\alpha$ -galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix. *Food Microbiology*. 30, 68-73.
- Chen M.J., Chen K.N., Kuo Y.T. (2007) Optimal thermotolerance of *Bifidobacterium bifidum* in gellan-alginate microparticles. *Biotechnology and Bioengineering*. 98, 411-419.
- Chen K.N., Kuo C.Y., Shiu J.S., Chen M.J. (2011) Process optimization for a novel kefir candy with high probiotic activity. *Journal of Food Process Engineering*. 34(2), 427-443.
- Chervaux C., Ehrlich S.D., Maguin E. (2000) Physiological Study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Strains in a Novel Chemically Defined Medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(12), 5306-5311.
- Chis A., Fetea F., Taoutaou A., Socaciu C. (2010) Application of FTIR spectroscopy for a rapid determination of some hydrolytic enzymes activity on sea buckthorn substrate. *Romanian Biotechnological Letters*. 15, 5738-5744.
- Chong E. (2014) A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30, 351-374.
- Coimbra M.A., Gonçalves F., Barros A.S., Delgadillo I. (2002) Fourier transform infrared spectroscopy and chemometric analysis of white wine polysaccharide extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 3405-3411.
- Cook M.T., Tzortzis G., Charalampopoulos D., Khutoryanskiy V.V. (2012) Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*. 162, 56-67.
- Corcoran B.M., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Stanton C. (2004) Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*. 96, 1024-1039.
- Cozzolino D., Roumeliotis S., Eglinton J. (2014) Feasibility study on the use of attenuated total reflectance MIR spectroscopy to measure the fructan content in barley. *Analytical Methods*. 6, 7710-7715.
- Crittenden R., Playne M.J. (2009) Prebiotics. In: Lee YK, Salminen S, eds. *Handbook of probiotics and prebiotics* 2nd ed. John Wiley, pp 535-581.
- Crittenden R., Weerakkody R., Sanguansri L., Augustin M.A. (2006) Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Applied and Environmental Microbiology*. 72, 2280-2282.
- Crowe J.H., Carpenter J.F., Crowe L.M. (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*. 60, 73-103.
- Crowe J.H., Hoekstra F.A., Crowe L.M. (1992) Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*. 54, 570-599.
- Crowe J.H., Crowe L.M., Carpenter J.F. (1993) Preserving dry biomaterials: The water replacement hypothesis, Part 2. *BioPharm*. 6, 40-43.
- Crowe J.H., Oliver A.E., Hoekstra F.A., Crowe L.M. (1997) Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: The role of vitrification. *Cryobiology*. 35, 20-30.

- Cyril J., Powell G.L., Duncan R.R., Baird W.V. (2002) Changes in membrane polar lipid fatty acids of seashore paspalum in response to low temperature exposure. *Crop Science*. 42, 2031-2037.
- de Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 23, 130-135.
- de Vos P., Faas M.M., Spasojevic M., Sikkema J. (2010) Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*. 20, 292-302.
- de Vrese M., Schrezenmeier J. (2008) Probiotics, Prebiotics and Synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 111, 1-66.
- Desai A.R., Powell I.B., Shah N.P. (2004) Survival and activity of probiotic lactobacilli in skim milk containing prebiotics. *Journal of Food Science*. 69, 57-60.
- Desmond C., Ross R.P., O'Callaghan E., Fitzgerald G., Stanton C. (2002) Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology*. 93, 1003-1011.
- Dianawati D., Mishra V., Shah N.P. (2013) Stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* during storage at room temperature at low aw. *Food Research International*. 50, 259-265.
- DiBaise J.K., Frank D.N., Mathur R. (2012) Impact of the gut microbiota on the development of obesity: current concepts. *The American Journal of Gastroenterology Supplements*. 1(1), 22-27.
- Donkor O.N., Nilmini S.L.I., Stolic P., Vasiljevic T., Shah N.P. (2007) Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*. 17, 657-665.
- Drouzas A.E., Tsami E., Saravacos G.D. (1999) Microwave/vacuum drying of model fruit gels. *Journal of Food Engineering*. 39(2), 117-122.
- Durance T.D., Sundaram J., Yaghmaee P., Burt H., Wang R. (2006) Technique for generation of porous biomaterials by application of radiant microwave energy under vacuum. *Biomaterials Conference*. 04/11/2006.
- Durance T.D., Yaghmaee P. (2011) Microwave dehydration of food and food ingredients. In: Murray Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*, 2nd Edition, Vol 4, pp. 617-628. Elsevier.
- Esbensen K.H. (2005) *Multivariate data analysis - In practice* (5th ed.). Esbjerg, Denmark: CAMO Process AS.
- Falade K.O., Olukini I., Adegoke G.O. (2004) Adsorption isotherm and heat of sorption of osmotically pretreated and air-dried pineapple slices. *European Food Research and Technology*. 218, 540-543.
- FAO/WHO 2002 Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf> > September 8th Jan 2014.
- Fellah A., Anjukandi P., Waterland M.R., Williams M.A.K. (2009) Determining the degree of methylesterification of pectin by ATR/FT-IR: Methodology optimization and comparison with theoretical calculations. *Carbohydrate Polymers*. 78, 847-853.
- Fernandez-Carretero F.J., Riande E., del Río C., Sanchez F., Acosta J.L., Compan V. (2010) Preparation and characterization of hybrid membranes based on Nafion® using partially sulfonated inorganic fillers. *Journal of New Materials for Electrochemical Systems*. 13, 83-93.

- Flores-Maltos D.A., Mussatto S.I., Contreras-Esquivel J.C., Rodríguez-Herrera R., Teixeira J., Aguilar C. (2016) Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. *Critical reviews in biotechnology*. 36(2), 259-267.
- Fonseca F., Cenard S., Passot S. (2015) Freeze-drying of lactic acid bacteria. *Methods in Molecular Biology*. 1257, 477-488.
- Fox T.G., Flory P.J. (1950) Second-Order transition temperatures and related properties of polystyrene. I. Influence of molecular weight. *Journal of Applied Physics*. 21, 581-591.
- Fritzen-Freire C.R., Prudêncio E.S, Amboni R.D.M.C., Pinto S.S., Negrão-Murakami A.N., Murakami F.S. (2012) Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*. 45, 306-312.
- Fu N., Chen X.D. (2011) Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*. 44(5), 1127-1149.
- Fuentes-Zaragoza E., Sánchez-Zapata E., Sendra E., Sayas E., Navarro C., Fernández-López J., Pérez-Alvarez, J.A. (2011) Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch*. 63, 406-415.
- Galdeano M.C., Mali S., Grossmann M.V.E., Yamashita F., García M.A. (2009) Effects of plasticizers on the properties of oat starch films. *Materials Science and Engineering: C*. 29, 532-538.
- Garrote G.L., Abraham A.G. De Antoni G.L. (2001) Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*. 68, 639-652.
- Geladi P., Kowalski B.R. (1986) Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica chimica acta*. 185, 1-17.
- Gerbino E., Mobili P., Tymczyszyn E., Fausto R., Gómez-Zavaglia A. (2011) FTIR spectroscopy structural analysis of the interaction between *Lactobacillus kefir* S-layers and metal ions. *Journal of Molecular Structure*. 987, 186-192.
- Gerez C.L., Torino M.I., Rollán G., Font de Valdez G. (2009) Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*. 20(2), 144-148.
- Ghiamati E., Manoharan R., Nelson W.H. Sperry J.F. (1992) UV resonance Raman spectra of *Bacillus* spores. *Applied Spectroscopy*. 46: 357-364.
- Gialamas H., Zinoviadou K.G., Biliaderis C.G., Koutsoumanis K.P. (2010) Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*. 43, 2402-2408.
- Gibson G.R., Probert H.M., Van Loo J., Rastall R.A., Roberfroid M.B. (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 17, 259-275.
- Gibson G.R., Roberfroid M.B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125, 1401-1412.
- Giraffa G., Chanishvili N., Widayastuti Y. (2010) Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*. 161(6), 480-7.
- Golowczyc M., Vera C., Santos M., Guerrero C., Carasi P., Illanes A., Gómez-Zavaglia A., Tymczyszyn E.E. (2013) Use of whey permeate containing in situ synthesized galacto-oligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Dairy Research*. 80, 374-381.

- Golowczyc M.A., Gerez C.L., Silva J., Abraham A.G., De Antoni G.L., Teixeira P. (2011) Survival of spray-dried *Lactobacillus kefir* is affected by different protectants and storage conditions. *Biotechnology letters*. 33, 681-686.
- Golowczyc M.A., Silva J., Teixeira P., De Antoni G.L., Abraham A. (2011) Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. *International Journal of Food Microbiology*. 144, 556-560.
- Gómez-Zavaglia A., Abraham A., Giorgieri S., De Antoni G. (1999) Application of polyacrylamide gel electrophoresis and capillary gel electrophoresis to the analysis of *Lactobacillus delbrueckii* whole-cell proteins. *Journal of Dairy Science*. 82, 870-877.
- Gostner A., Blaut M., Schäffer V., Kożianowski G., Theis S., Klingenberg M., Dombrowski Y., Martin D., Ehrhardt S., Taras D., Schwiertz A., Kleessen B., Lühns H., Schaubert J., Dorbath D., Menzel T., Scheppach W. (2006) Effect of isomalt consumption on faecal microflora and colonic metabolism in healthy volunteers. *British Journal of Nutrition*. 95, 40-50.
- Guerrero S., Alzamora S.M., Gerschenson L.N. (1996) Optimization of a combined factors technology for preserving banana puree to minimize colour changes using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*. 28: 307–322.
- Hayashi H., Kumazawa E., Saeki Y., Ishioka Y. (1983) Continuous vacuum dryer for energy saving. *Drying Technol.* 1, 275-284.
- Hansen E.B. (2002) Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*. 78, 119-131.
- Herigstad B., Hamilton M., Heersink J. (2001) How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 44(2), 121-129.
- Higl B., Kurtmann L., Carlsen C.U., Ratjen J., Forst P., Skibsted L.H., Kulozik U., Risbo J. (2007) Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. *Biotechnology Progress*. 23, 794-800.
- Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Berni Canani R., Flint H.J., Salminen S., Calder P.C. Sanders M.E. (2014) Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 11, 506-514.
- Hincha D.K., Livingston D.P., Premakumar R., Zuther E., Obel N., Cacela C., Heyer A.G. (2007) Fructans from oat and rye: Composition and effects on membrane stability during drying. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1768, 1611-1619.
- Hincha D.K., Popova A.V., Cacela C. (2006) Effects of sugars on the stability of lipid membranes during drying, in: A. Leitmannova Liu (Ed.), *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*, vol. 3, Elsevier, Amsterdam, pp. 189-217.
- Hincha D.K., Zuther E., Heyer A.G. (2003) The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1612, 172-177.

- Hincha D.K., Hellwege E.M., Heyer A.G., Crowe J.H. (2000) Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze drying. *European Journal of Biochemistry*. 267, 535-540.
- Hincha D.K., Zuther E., Hellwege E.M., Heyer A.G. (2002) Specific effects of fructo- and glucooligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology*. 12, 103-110.
- Hiraoka Y., Kimbara K. (2002) Rapid assessment of the physiological status of the polychlorinated biphenyl degrader *Comamonas testosteroni* TK102 by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 2031-2035.
- Hofsets K., Lopes C.C. (2005) Crispy banana obtained by the combination of a high temperature and short time drying stage and a drying process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 22, 285-292.
- Homayouni A., Azizi A., Ehsani M.R., Yarmand M.S., Razavi S.H. (2008) Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*. 111, 50-55.
- Hotchkiss A.T., Liu L.S., Call J.E., Cooke P.H., Luchansky J.B., Rastall R.A. (2008) Synbiotic matrices derived from plant oligosaccharides and polysaccharides. In: Parris N., Liu L., Song C. and Shastri P. (Eds.) *New delivery systems for controlled drug release from naturally occurring materials*. ACS Symposium Series 992. American Chemical Society, Washington, DC, USA, pp. 69-77.
- Huang H., Yu H., Xu H., Ying Y. (2008) Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *Journal of Food Engineering*. 87(3), 303-313.
- Huang W.E., Griffiths R.I., Thompsom I.P., Bailey M.J., Whiteley A.S. (2004) Raman microscopic analysis of single microbial cells. *Analytical Chemistry*. 76: 4452-4458.
- Hugo A.A., Kakisu E., De Antoni G.L. Pérez P.F. (2008) Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. *Letters in Applied Microbiology*. 46, 613-619.
- Iglesias H.A., Chirife J. (1981) An equation for fitting uncommon water sorption isotherms in foods. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 14, 105-106.
- Imamura K., Ogawa T., Sakiyama T., Nakanishi K. (2003) Effects of types of sugar on the stabilization of protein in the dried state. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 92, 266-274.
- Ishwarya S.P., Anandharamakrishnan C., Stapley A.G. (2015) Spray-freeze-drying: A novel process for the drying of foods and bioproducts. *Trends in Food Science & Technology*. 41(2), 161-181.
- Iseppi R., Pilati F., Marini M., Toselli M., de Niederháusern S., Guerrieri E., Messi P., Sabia C., Manicardi G., Anacarso I. (2008) Anti-listerial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with Enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *International Journal of Food Microbiology*. 123(3), 281-287.
- Iyer C., Kailasapathy K. (2005) Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Journal of Food Science*. 70, M18-M23.
- Jalae F., Fazeli A., Fatemian H., Tavakolipour H. (2011) Mass transfer coefficient and the characteristics of coated apples in osmotic dehydrating. *Food and Bioproducts Processing*. 89, 367-374.

- Jung K.H., Yun J.W., Kang K.R., Lim J.Y., Lee J.H. (1989) Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. *Enzyme Microbial Technology*. 11, 491-494.
- Kačuraková M., Wilson R.H. (2001) Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*. 44, 291-303.
- Kailasapathy K. (2009) Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*. 4, 1-19.
- Kakisu E., Abraham A.G., Tironi Farinati C., Ibarra C., De Antoni G.L. (2013a) *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir protects vero cells from cytotoxicity by type-II Shiga toxin from *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Dairy Research*. 80, 64-71.
- Kakisu E., Bolla P., Abraham A.G., de Urza P., De Antoni G.L. (2013b) *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir: Protection of cultured Hep-2 cells against *Shigella* invasion. *International Dairy Journal*. 33, 22-26.
- Kanmani P., Lim S.T. (2013) Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. *Food Chemistry*. 141, 1041–1049.
- Kataoka Y., Kondo T. (1999) Quantitative analysis for the cellulose alfa crystalline phase in developing wood cell walls. *International journal of biological macromolecules*. 24(1), 37-41.
- Kent R.M., Doherty S.B. (2014) Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. *Food Research International*. 64, 567-576.
- Khandekar D.C., Palai T., Agarwal A., Bhattacharya P.K. (2014) Kinetics of sucrose conversion to fructo-oligosaccharides using enzyme (invertase) under free condition. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 37, 2529-2537.
- Kim S.S., Bhowmik S.R. (1995) Effective moisture diffusivity of plain yogurt. Undergoing microwave vacuum drying. *Journal of Food Engineering*. 24, 137-148.
- King V.A.E., Su J.T. (1993) Dehydration of *Lactobacillus acidophilus*. *Process. Biochem*. 28: 47-52
- Kizil R., Irudayaraj J., Seetharaman K. (2002) Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 3912-3918.
- Klemmer K.J., Korber D.R., Low N.H., Nickerson M.T. (2011) Pea protein-based capsules for probiotic and prebiotic delivery. *International Journal of Food Science & Technology*. 46, 2248-2256.
- Komatsu T.R., Buriti F.C.A., Saad S.M.I. (2008) Overcoming hurdles through innovation, persistence and creativeness in the development of probiotic foods. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 44, 329–347.
- König H., Uden G., Fröhlich J. (2009) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Book. Springer.
- Kramer S.P., Brett J., Freeman M., Gilbert R., Lightfoot N. (1992) Application of pyrolysis mass spectrometry to the investigation of outbreaks of food poisoning and non-gastrointestinal infection associated with *Bacillus* species and *Clostridium perfringens*. *International Journal of Food Microbiology*. 17(1), 57-66.

- Krasaekoopt W., Watcharapoka S. (2014) Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT Food Science and Technology*. 57, 761-766.
- Krumbeck J.A., Maldonado-Gomez M.X., Ramer-Tait A.E., Hutkins R.W. (2016) Prebiotics and synbiotics: dietary strategies for improving gut health. *Current opinion in gastroenterology*. 32(2), 110-119.
- Kumar M., Kumar A., Nagpal R., Mohania D., Behare P., Verma V., Kumar P., Poddar D., Aggarwal P.K., Henry C.J., Jain S., Yadav H. (2010) Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 61, 473-496.
- Labischinski H. (1991) Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature*. 351(6321), 81-82.
- Labuza T.P., McNally L., Gallagher D., Hawkes J., Hurtado F. (1972) Stability of intermediate moisture foods. 1. Lipid Oxidation. *Journal of Food Science*. 37, 154-159.
- Lapsiri W., Bhandari B., Wanchaitanawong P. (2012) Viability of *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in different protectants during spray drying and storage. *Drying Technology: An International Journal*. 30, 1407-1412.
- Leslie S., Israeli E., Lighthart B., Crowe J.H., Crowe L.M. (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 3592-3597.
- Li L., Shan H., Yue C.Y., Lam Y.C., Tam K.C., Hu X. (2002) Thermally induced association and dissociation of methylcellulose in aqueous solutions. *Langmuir*. 18, 7291-7298.
- Li L., Thangamathesvaran P.M., Yue C.Y., Tam K.C., Hu X., Lam Y.C. (2001) Gel Network Structure of Methylcellulose in Water. *Langmuir*. 17(26), 8062-8068.
- Lievens L.C., Verbeek M.A.M., Vanriet K., Noomen A. (1994) Mechanism of dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41, 90-94.
- Lin S.Y., Wang S.L., Wei Y.S., Li M.J. (2007) Temperature effect on water desorption from methylcellulose films studied by thermal FT-IR microspectroscopy. *Surface Science*. 601, 781-785.
- Linders L.J.M., Wolkers W.F., Hoekstra F.A., van 't Riet K. (1997) Effect of added carbohydrates on membrane phase behavior and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. *Cryobiology*. 35, 31-40.
- Liu Y., Ding T., Xu S., Wu B., Shen C., Zhang R., Wang Y., Fei X. Determination of fructo-oligosaccharides in milk powder by high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography (Se Pu)*. 33(10), 1040-1045.
- Lodato P., Segovia de Huergo M., Buera M.P. (1999) Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in different sugar and polymer matrices. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52, 215-220.
- López de Lacey A.M., López-Caballero M.E., Gómez-Estaca J., Gómez-Guillén M.C., Montero P. (2012) Functionality of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* incorporated to edible coatings and films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 16, 277-282.

- Lorenzoni A.S.G., Aydos L.F., Klein M.P., Ayu M.A.Z., Rodrigues R.C., Hertz P.F. (2015) Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 111, 51-55.
- Lorenzoni A.S.G., Aydos L.F., Klein M.P., Rodrigues Plinho R.C., Hertz F. (2014) Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized alfa-fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. *Carbohydrate Polymers*. 103, 193-197.
- Lusas E. W., Rooney L. W. (2001) *Snack foods processing*. CRC Press.
- Maftoonazad N., Ramaswamy H. (2005) Postharvest shelf-life extension of avocados using methyl cellulose-based coating. *LWT-Food Science and Technology*. 38(6), 617-624.
- Maftoonazad N., Ramaswamy H.S., Marcotte M. (2008) Shelf-life extension of peaches through sodium alginate and methyl cellulose edible coatings. *International journal of food science & technology*. 43(6),951-957.
- Mandal S., Hati S., Puniya A.K., Singh R., Singh K. (2013) Development of symbiotic milk chocolate using encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. *Journal of Food Processing and Preservation*. 37, 1031-1037.
- Martens H., Næs T. (1989) Methods for calibration. In: *Multivariate Calibration*. Chichester, England, Wiley and Sons Ltd: Chapter 3, pp. 97-112.
- Martens H., Martens M. (2000) Modified Jack-knife estimation of parameter uncertainty in bilinear modelling by partial least squares regression (PLSR). *Food quality and preference*. 11(1), 5-16.
- Martens H., Næs T. (1989) Methods for calibration. In: H. Martens & T. Næs (Eds.), *Multivariate calibration* (pp. 97). John Wiley & Sons. New York Inc.
- Martens H., Nielsen J.P., Engelsen S.B. (2003) Light scattering and light absorbance separated by extended multiplicative signal correction. Application to near-infrared transmission analysis of powder mixtures. *Analytical Chemistry*. 75: 394-404.
- Martínez-Cervera S., Salvador A., Sanz T. (2014) Comparison of different polyols as total sucrose replacers in muffins: Thermal, rheological, texture and acceptability properties. *Food Hydrocolloids*. 35, 1-8.
- Martínez-Villaluenga C., Frías J., Gómez R., Vidal-Valverde C. (2006) Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. *International Dairy Journal*. 16, 768-774.
- Massart D.L., Vandeginste B.G., Buydens L., Lewi P., Smeyers-Verbeke J. (1997) *Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A*. Elsevier Science Inc.
- Mathlouthi M., Seuvre A.M., Koenig J.L. (1986) FT-IR and laser-Raman spectra of cytosine and cytidine. *Carbohydrate research*. 146(1), 1-13.
- Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fonden R., Saarela M. (2002) Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*. 12, 173-182.
- Mellado-Mojica E., López M.G. (2015) Identification, classification, and discrimination of agave syrups from natural sweeteners by infrared spectroscopy and HPAEC-PAD. *Food Chemistry*. 167, 349-357.

- Meng X.C., Stanton C., Fitzgerald G.F., Daly C., Ross R.P. (2008) Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*. 106, 1406-1416.
- Metchnikoff E. (1908) *The prolongation of life*. Putnam.
- Miao S., Mills S., Stanton C., Fitzgerald G.F., Roos Y.H., Ross R.P. (2008) Effect of disaccharides on survival during storage of freeze dried probiotics. *Dairy Science & Technology*. 88, 19-30.
- Milhaud J. (2004) New insights into water-phospholipid model membrane interactions. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1663, 19-51.
- Mitropoulou G., Nedovic V., Goyal A., Kourkoutas Y. (2013) Immobilization technologies in probiotic food production. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2013, 1-15.
- Moayednia N., Ehsani M.R., Emamdjomeh Z., Asadi M.M., Mizani M., Mazaheri A.F. (2009) The effect of sodium alginate concentrations on viability of immobilized *Lactobacillus acidophilus* in fruit alginate coating during refrigerator storage. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 3, 3213-3216.
- Mobili P., Londero A., Maria T., Eusebio M., De Antoni G., Fausto R., Gomez-Zavaglia A. (2009) Characterization of S-layer proteins of *Lactobacillus* by FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Vibrational Spectroscopy*. 50(1), 68-77.
- Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G. (2006) Preservation of micro-organisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*. 66, 183-193.
- Mucha M., Pawlak A. (2005) Thermal analysis of chitosan and its blends. *Thermochimica Acta*. 427, 69-76.
- Mumenthaler M., Leuenberger H. (1991) Atmospheric spray-freeze drying: a suitable alternative in freeze-drying technology. *International journal of pharmaceutics*. 72(2), 97-110.
- Nasatto P., Pignon F., Silveira J., Duarte M., Nosedá M., Rinaudo M. (2015) Methylcellulose, a Cellulose Derivative with Original Physical Properties and Extended Applications. *Polymers*. 7(5), 777.
- Navarro A.S., Ferrero C., Zaritzky N.E. (1999) Rheological Characterization of "Dulce de leche" by dynamic and steady shear measurements. *Journal of Texture Studies*. 30(1), 43-58.
- Nazzaro F., Fratianni F., Coppola R., Sada A., Orlando P. (2009) Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*. 1, 319-323.
- Nemcova R. (1997) Criteria for selection of lactobacilli for probiotic use. *Vet Med*. 42(1), 19-27.
- Nishizawa K., Nakajima M., Nabetani H. (2001) Kinetic study on transfructosylation by fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 and availability of a membrane reactor for fructooligosaccharide production. *Food Science and Technology Research*. 7, 39-44.
- Nobre C., Teixeira J., Rodrigues L. (2012) Fructo-oligosaccharides purification from a fermentative broth using an activated charcoal column. *New biotechnology*. 29(3), 395-401.
- Nojavan S., Khaliliana F., Momen Kiaiee F., Rahimic A., Arabanianc A., Chalavia S. (2008) Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of *Rosa canina* L. fruit. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21, 300-305.
- Noorbakhsh R., Yaghmaee P., Durance T. (2013) Radiant energy under vacuum (REV) technology: A novel approach for producing probiotic enriched apple snacks. *Journal of Functional Foods*. 5(3), 1049-1056.

- Nualkaekul S., Deepika G., Charalampopoulos D. (2012) Survival of freeze dried *Lactobacillus plantarum* in instant fruit powders and reconstituted fruit juices. *Food Research International*. 48, 627-633.
- O'Brien-Nabors L. (2001) *Alternative Sweeteners*. Third Edition edited by Lyn Marcel Dekker, Inc. New York, USA. Wijers M.C. & Strater P.J. Chap. 15. Isomalt pp.265-282.
- Okuro P.K., Thomazini M., Balieiro J.C.C., Liberal R.D.C.O., Fávoro-Trindade C.S. (2013) Co- encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. *Food Research International*. 53, 96-103.
- Oldenhof H., Wolkers W. F., Fonseca F., Passot S., Marin M. (2005) Effect of sucrose and maltodextrin on the physical properties and survival of air-dried *Lactobacillus bulgaricus*: An in situ Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biotechnology Progress*. 21, 885-892.
- Park J.S., Ruckenstein E. (2001) Viscoelastic properties of plasticized methylcellulose and chemically crosslinked methylcellulose. *Carbohydrate Polymers*. 46, 373-381.
- Paseephol T., Sherkat F. (2009) Probiotic stability of yoghurts containing Jerusalem artichoke inulins during refrigerated storage. *Journal of Functional Foods*. 1, 311-318.
- Patel S., Goyal A. (2012) The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech*. 2(2), 115-125.
- Payton N.M., Wempe M.F., Xu Y., Anchordoquy T.J. (2014) Long-term storage of lyophilized liposomal formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 103, 3869-3878.
- Pérez O.E., Sanchez C.C., Pilosof A.M.R., Patino J.M.R. (2008) Dynamics of adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*. 22, 387-402.
- Petruláková M., Valík, Ľ. (2015) Food allergy and intolerance. *Acta Chimica Slovaca*. 8(1), 44-51
- Phuapaiboon P., Leenanon B., Levin R. (2013) Effect of *Lactococcus lactis* immobilized within pineapple and yam bean segments, and jerusalem artichoke powder on its viability and quality of yogurt. *Food and Bioprocess Technology*. 6, 2751-2762.
- Pikal-Cleland K.A., Carpenter J.F. (2001) Lyophilization-induced protein denaturation in phosphate buffer systems: Monomeric and tetrameric  $\beta$ -Galactosidase. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 90, 1255-1268.
- Patente: Producto alimenticio funcionalizado con probióticos y prebióticos y método para su preparación (en trámite) Instituto Nacional de la Propiedad Intelectual (INPI). Inventores: M.J. Tavera-Quiroz, N. Romano, P. Mobili, A. Pinotti, A. Gómez-Zavaglia, N. Bertola. Fecha de presentación 05/08/2015. Titular: CONICET/UNLP. Acta: P20150102508.
- Radowski A. (2006) Isomalt in breakfast cereals, granola bars, and muesli. *Cereals Food World*. 51, 254-256.
- Rajkumar H., Kumar M., Das N., Kumar S.N., Challa H.R., Nagpal R. (2015) Effect of Probiotic *Lactobacillus salivarius* UBL S22 and Prebiotic Fructo-oligosaccharide on Serum Lipids, Inflammatory Markers, Insulin Sensitivity, and Gut Bacteria in Healthy Young Volunteers: A Randomized Controlled Single-Blind Pilot Study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 20(3): 289-98.
- Ramesh M.N., Siddalingaiya G.P. (2006) Edible films and coatings based on fructooligosaccharides with probiotic properties. Patent Wipo WO/2006/103698.

- Raudonus J., Bernard J., Janßen H., Kowalczyk J., Carle R. (2000) Effect of oligomeric or polymeric additives on glass transition, viscosity and crystallization of amorphous isomalt. *Food Research International*. 33, 41-51.
- Rezzonico E., Mercenier A., Baetge E., Parkinson S., Beck T., le Coutre J., Brasow H. (2015) Nestle research on nutrition and the human gut microbiome. *Scientific American*. 312(3), 79-85.
- Ricker J.V., Tsvetkova N.M., Wolkers W.F., Leidy C., Tablin F., Longo M., Crowe J.H. (2003) Trehalose maintains phase separation in an air-dried binary lipid mixture. *Biophysical Journal*. 84, 3045-3051.
- Ringel Y., Quigley E.M., Lin H.C. (2012) Using probiotics in gastrointestinal disorders. *The American Journal of Gastroenterology Supplements*. 1(1), 34-40.
- Rivero S., García M.A., Pinotti A. (2012) Heat treatment to modify the structural and physical properties of chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60, 492-499.
- Rokka S., Rantamäki P. (2010) Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research Technology*. 231, 1-12.
- Romanin D., Serradell M., González Maciel D., 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(2-3), 102–108.
- Romano N., Santos M., Mobili P., Vega R., Gómez-Zavaglia A. (2016) Effect of sucrose concentration on the composition of enzymatically synthesized short-chain fructo-oligosaccharides as determined by FTIR and multivariate analysis. *Food Chemistry*. 202, 467-475.
- Romano N., Schebor C., Mobili P., Gómez-Zavaglia A. (2016) Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Research International*. 90, 251-258.
- Romano N., Tavera-Quiroz M.J., Bertola N., Mobili P., Pinotti A., Gomez-Zavaglia A. (2014) Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International*. 64, 560-566.
- Romano N., Tymczyszyn E., Mobili P., Gómez-Zavaglia, A. (2015) Prebiotics as protectants of lactic acid bacteria. In: Watson RR, Preedy VR, eds. *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*. 2nd ed. Academic Press, Elsevier. Part 1: Prebiotics in health promotion. Chapter 10, pp 155-164.
- Roos Y. (1993) Melting and glass transitions of low molecular weight carbohydrates. *Carbohydrate Research*. 238, 39-48.
- Roos Y., Karel M. (1991) Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars. *Biotechnology Progress*. 7, 49-53.
- Roos Y.H. (1995) *Phase Transitions in Food*. Academic Press, New York.
- Ross R.P., Desmond C., Fitzgerald G.F., Stanton C. (2005) Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*. 98, 1410-1417.

- Russo P., de Chiara M.L.V., Capozzi V., Arena M.P., Amodio M.L., Rascón A., Dueñas M.T., López P., Spano G. (2016) *Lactobacillus plantarum* strains for multifunctional oat-based foods. *LWT-Food Science and Technology*. 68, 288-294.
- Saad S.M.I. (2006) Probiotics and prebiotics: The state of the art. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 42, 1-16.
- Saad N., Delattre C., Urdaci M., Schmitter J.M., Bressollier P. (2013) An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT- Food Science and Technology*. 50, 1-16.
- Saarela M., Virkajärvi I., Nohynek L., Vaari A., Mättö J. (2006) Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *International Journal of Food Microbiology*. 112(2), 171–8.
- Sabater-Molina M., Larquá E., Torrella F., Zamora S. (2009) Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 65(3), 315-328.
- Samios D., Tokumoto S., Denardin E.L.G. (2006) Investigation of the large plastic deformation of iPP induced by plane strain compression: Stress–strain behavior and thermo-mechanical properties. *International Journal of Plasticity*. 22, 1924-1942.
- Sánchez B., Delgado S., Blanco-Míguez A., Lourenco A., Gueimonde M., Margolles A. (2016) Probiotics, gut microbiota and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition & Food Research*. doi: 10.1002/mnfr.201600240
- Sánchez-González L., Quintero Saavedra J.I., Chiralt A. (2013) Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*. 33, 92-98.
- Santivarangkna C., Higl B., Foerst P. (2008) Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiology*. 25, 429-441.
- Santivarangkna C., Kulozik U., Foerst P. (2007) Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology Progress*. 23, 302-315
- Santivarangkna C., Naumann D., Kulozik U., Foerst P. (2010) Protective effects of sorbitol during the vacuum drying of *Lactobacillus helveticus*: an FT-IR study. *Annals of Microbiology*. 60, 235-242.
- Santos M., Araujo-Andrade C., Tymczyszyn E.E., Gómez-Zavaglia A. (2014c) Determination of amorphous/rubbery states in freeze-dried prebiotic sugars using a combined approach of near-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Food Research International*. 64, 514-519.
- Santos M.I., Araujo-Andrade C., Esparza-Ibarra E., Tymczyszyn E., Gómez-Zavaglia A. (2014a) Galacto-oligosaccharides and lactulose as protectants against desiccation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Biotechnology Progress*. 30, 1231-1238.
- Santos M.I., Gerbino E., Araujo-Andrade C., Tymczyszyn E.E., Gómez-Zavaglia A. (2014b) Stability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in the presence of galacto-oligosaccharides and lactulose as determined by near infrared spectroscopy. *Food Research International*. 59, 53-60.
- Santos M.I., Gerbino E., Tymczyszyn E.E., Gomez-Zavaglia A. (2015) Applications of infrared and Raman spectroscopies to probiotic investigation. *Foods*. 4, 283-305.

- Sathyabama S., Ranjith Kumar M., Bruntha Devi P., Vijayabharathi R., Brindha Priyadharisini V. (2014) Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. *LWT - Food Science and Technology*. 57, 419-425.
- Scaman C.H., Durance T.D. (2005) Combined microwave vacuum drying. In D- W. Sun (Ed.), *Emerging technologies for food processing* (pp. 507–533). Oxford, UK: Elsevier Ltd.
- Schebor C., Buera P., Karel M., Chirife J. (1999) Color formation due to non-enzymatic browning in amorphous, glassy, anhydrous, model systems. *Food Chemistry*. 65, 427–432.
- Schindler R., Le Thanh H., Lendl B., Kellner R. (1998) Determination of enzyme kinetics and chemometric evaluation of reaction products by FTIR spectroscopy on the example of  $\beta$ -fructofuranosidase. *Vibrational Spectroscopy*. 16, 127-135.
- Schiweck H., Munir M., Rapp K.M., Schenider B., Bogel M. (2000) New developments in the use of sucrose as an industrial bulk chemical. *Zuckerindustrie*. 115, 555-565.
- Schoonman A., Ubbink J., Bisperink C., Le Meste M., Karel M. (2002) Solubility and diffusion of nitrogen in maltodextrin/protein tablets. *Biotechnology Progress*. 18, 139-154.
- Schrezenmeir J.R., de Vrese M. (2001) Probiotics, prebiotics, and synbiotics; approaching a definition. *The American journal of clinical nutrition*. 73(2), 361s-364s.
- Schultz C., Naumann D. (1991) In vivo study of the state of order of the membranes of Gram-negative bacteria by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). *FEBS letters*. 294(1-2), 43-46.
- Schwab C., Vogel R., Gänzle M.G. (2007) Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. *Cryobiology*. 55, 108-114.
- Sekhon B.S., Jairath S. (2010) Prebiotics, probiotics and synbiotics: an overview. *Journal of pharmaceutical education and research*. 1(2), 13.
- Sendra E., Fayos P., Lario Y., Fernández-López J., Sayas-Barberá E., Pérez-Alvarez J. A. (2008) Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiology*. 25(1), 13–21.
- Shah N.P. (2007) Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*. 17(11), 1262–1277.
- Shreiner A.B., Kao J.Y., Young V.B. (2015) The gut microbiome in health and in disease. *Current opinion in gastroenterology*. 31(1), 69.
- Shrestha A.K., Howes T., Adhikari B.P., Bhandari B.R. (2007) Water sorption and glass transition properties of spray dried lactose hydrolysed skim milk powder. *LWT - Food Science and Technology*. 40, 1593-1600.
- Shu G., Hu M., Qin T., Chen H., Qi M. (2012) Effect of fructo-oligosaccharide, isomalto-oligosaccharide, inulin and xylo-oligosaccharide on survival of *Bifidobacterium bifidum* during freeze-drying. *Advanced Materials Research*. 382, 454-457.
- Siro I., Kopolna E., Kopolna B., Lugasi A. (2008) Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance. A review. *Appetite*. 51(3), 456-467.
- Soukoulis C., Behboudi-Jobbehdar S., Yonekura L., Parmenter C., Fisk I. (2014a) Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films. *Food Chemistry*. 159, 302–308.

- Soukoulis C., Yonekura L., Gan H-H., Behboudi-Jobbehdar S., Parmenter C., Fisk I. (2014b) Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocolloids*. 39, 231-242.
- Steinert R., Sadabad M., Harmsen H., Weber P. (2016) The prebiotic concept and human health: a changing landscape with riboflavin as a novel prebiotic candidate?. *European Journal of Clinical Nutrition*. doi: 10.1038/ejcn.2016.119
- Sultana K., Godward G., Reynolds N., Arumugaswamy R., Peiris P. (2000) Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Journal of Food Microbiology*. 62, 47-55.
- Sun W.Q., Leopold A.C., Crowe L.M., Crowe J. H. (1996) Stability of dry liposomes in sugar glasses. *Biophysical Journal*. 70(4), 1769-1776.
- Tabbers M., Benninga M. (2007) Administration of probiotic lactobacilli to children with gastrointestinal problems: there is still little evidence. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*. 151(40), 2198-2202.
- Tapia M.S., Rojas-Graü M.A., Rodríguez F.J., Ramírez J., Carmona A., Martín-Belloso O. (2007) Alginate- and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *Journal of Food Science*. 72, E190-E196.
- Tavera-Quiroz M.J., Lecot J., Bertola N., Pinotti A. (2013) Stability of methylcellulose-based films after being subjected to different conservation and processing temperatures. *Materials Science and Engineering: C*. 33, 2918-2925.
- Tavera-Quiroz M.J., Romano N., Mobili P., Pinotti A., Gómez-Zavaglia A., Bertola N. (2015) Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of methylcellulose containing *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Functional Foods*. 16, 164-173.
- Tavera-Quiroz M.J., Urriza M., Pinotti A., Bertola N. (2015) Baked snack from green apples formulated with the addition of isomalt. *LWT - Food Science and Technology*. 62, 1004-1010.
- Tavera-Quiroz M.J., Urriza M., Pinotti A., Bertola N. (2014) Development and Characterization of a Baked Snack from Rings of Green Apples. *Food and Bioprocess Technology*. 7(8), 2218-2227.
- Torres D.P.M., Bastos M., Goncalve, M.P.F., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. (2011) Water sorption and plasticization of an amorphous galacto-oligosaccharide mixture. *Carbohydrate Polymers*. 83, 831-835.
- Tripathi M.K., Giri S.K. (2014) Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. 9, 225-241.
- Trollope K.M., Nieuwoudt H.H., Görgens J.F., Volschenk H. (2014) Screening a random mutagenesis library of a fungal  $\beta$ -fructofuranosidase using FT-MIR ATR spectroscopy and multivariate analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98, 4063-4073.
- Trollope K.M., Volschenk H., Görgens J.F., Bro R., Nieuwoudt H.H. (2015) Direct, simultaneous quantification of fructooligosaccharides by FT-MIR ATR spectroscopy and chemometrics for rapid identification of superior, engineered  $\beta$ -fructofuranosidases. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 407, 1661-1671.
- Tymczyszyn E.E., Gerbino E., Illanes A., Gómez-Zavaglia A. (2011) Galacto-oligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Cryobiology*. 62, 123-129.

- Tymczyszyn E.E., Gómez-Zavaglia A., Disalvo E.A. (2007b) Effect of sugars and growth media on the dehydration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Applied Microbiology*. 102, 845-851.
- Tymczyszyn E.E., Sosa N., Gerbino E., Hugo A., Gómez-Zavaglia A., Schebor C. (2012) Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *International Journal of Food Microbiology*. 155, 217-221.
- Tymczyszyn E.E., Díaz M.R., Gómez-Zavaglia A., Disalvo E.A. (2007a) Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *Journal of Applied Microbiology*. 103, 2410-2419.
- Tymczyszyn E.E., Díaz M.R., Pataro A., Sandonato N., Gómez-Zavaglia A., Disalvo E.A. (2008) Critical water activity for the preservation of *Lactobacillus bulgaricus* by vacuum drying. *International Journal of Food Microbiology*. 128, 342-347.
- Valdés-Varela L., Ruas-Madiedo P., Gueimonde M. (2017) In vitro fermentation of different fructo-oligosaccharides by *Bifidobacterium* strains for the selection of synbiotic combinations. *International Journal of Food Microbiology*. 242, 19-23.
- Valluru R., van der Ende W. (2008) Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany*. 59, 2905-2916.
- Varela P., Chen J., Fiszman S., Povey M.J.W. (2006) Crispness assessment of roasted almonds by an integrated approach to texture description: texture, acoustics, sensory and structure. *Journal of Chemometrics*. 20, 311-320.
- Vega R.J., Zuñiga-Hansen M.E. (2011) Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology. *Bioresource Technology*. 102, 10180-10186.
- Vega R.J., Zuñiga-Hansen M.E. (2012) Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 76, 44-51.
- Vega R.J., Zuñiga-Hansen M.E. (2014) A new mechanism and kinetic model for the enzymatic synthesis of short-chain fructooligosaccharides from sucrose. *Biochemical Engineering Journal*. 82, 158-165.
- Vereyken I.J., Chupin V., Demel R.A., Smeekens S.C.M., De Kruijff B. (2001) Fructans insert between the headgroups of phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*. 1510, 307-320.
- Vereyken I.J., Chupin V., Hoekstra F.A., Smeekens S.C., de Kruijff B. (2003b) The effect of fructan on membrane lipid organization and dynamics in the dry state. *Biophysical Journal*. 84, 3759-3766.
- Vereyken I.J., Chupin V., Islamov A., Kuklin A., Hinch D.K., De Kruijff B. (2002) The effect of fructan on the phospholipid organization in the dry state. *Biophysical Journal*. 85, 3058-3065.
- Vereyken I.J., van Kuik J.A., Evers T.H., Rijken P.J., de Kruijff B. (2003a) Structural requirements of the fructan-lipid interaction. *Biophysical Journal*. 84, 3147-3154.
- Vincent J.F. (1998) The quantification of crispness. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 78, 162-168.
- Vivek K.B., Reddy K.K., Reddy P.V.M., Kumar M.S., Narsaiah K. (2013) Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics and their survivability in Dahi during storage. *International Journal of Agriculture and Food Science Technology*. 4, 67-75.

- Vos A., M'rabet L., Stahl B., Boehm G., Garssen J. (2007) Immune-modulatory effects and potential working mechanisms of orally applied nondigestible carbohydrates. *Critical Reviews in Immunology*. 27(2) 97-140.
- Weinbreck F., Bodnar I., Marco M.L. (2010) Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International Journal of Food Microbiology*. 136, 364-367.
- Wolkers W.F., Oliver A.E., Tablin F., Crowe J.H. (2004) A Fourier-transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. *Carbohydrate Research*. 339, 1077-1085.
- Yeo S.K., Liong M.T. (2010) Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90, 267-275.