



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ingeniería - Doctorado en Ciencias de la Ingeniería con mención en Ingeniería Química

Estudio del cultivo y concentración de una cepa *Lactobacillus plantarum* autóctona empleando un reactor y membranas semipermeables. Secado y estabilización de biomasa.



PAOLA DANIELA BUSTOS GUTIÉRREZ

CONCEPCIÓN-CHILE

2013

Profesor Guía: Rodrigo Bórquez Yáñez
Dpto. de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería
Universidad de Concepción





*A mis hijos
Enrique y Joaquín*



*¡Gracias por iluminar mi vida!
Los amo inmensamente... al infinito y más allá...*

Mamá

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen por estar siempre presente, cuidando cada paso que he dado en este largo camino y por poner tantas buenas personas a lo largo del recorrido.

A mi adorada Mamita por ser una fuente inagotable de amor y cuidados y por acompañarme en la lucha por mis sueños.

A mi querido Papá por enseñarme el valor del trabajo y de las personas más allá de los títulos.

A mi amado Jorge por su amor sin condiciones, por su paciencia, por su entrega, por su compañía y por darme el regalo más hermoso de mi vida: nuestra familia.

A mi querido primo-hermano Franco, por el cariño inmenso que nos tenemos y porque a pesar de los años y la distancia sabremos siempre que podemos contar uno con el otro.

A mi cuñadita, comadre y amiga, Fanny, por todo el apoyo y cariño que me ha entregado.

A mis suegros Mariela y Jorge, por su constante ayuda, preocupación y oraciones.

A mis amigos de Bioprocesos en especial a Natalia, Andrea, Pao P. Denisse, Jimmy y Javier. Por acompañarme en todo o parte del camino, por sus palabras de aliento, por su ayuda, por los lindos momentos que viví junto a ustedes durante todos estos años. Los tendré siempre en mi corazón.

A mis amigas mamás Verito Sanhueza y Andrea Barrientos por compartir conmigo la experiencia de que ser madre y trabajar no era tan fácil como nos habían dicho, pero que aún así podemos disfrutarlo y salir airoosas.

A mi profesor guía Dr. Rodrigo Bórquez por no perder la fe en mí aún en los momentos más complicados.

A la profesora Estrella Aspé por su permanente preocupación y consejos durante todos mis años de estudiante.

Al Dr. José Navarrete de la UBB por la confianza depositada y por el empuje a dar este último paso.



RESUMEN

A fin de formular un producto probiótico deshidratado estable en base a una cepa autóctona *Lactobacillus plantarum*, con miras a su uso profiláctico en la industria salmonera, se planteó un esquema productivo que contaba con las etapas de cultivo, concentración por membranas y estabilización de biomasa mediante secado por atomización.

Para cada una de las etapas antes descritas se estudiaron las variables, que de acuerdo a literatura, tenían una mayor incidencia en la eficiencia de la operación, entendiéndose por eficiencia, no sólo el rendimiento o la productividad, si no también el recuento de microorganismos viables presentes. Fue así como para la etapa de cultivo se consideró el modo de operación: batch, fedbatch, continuo, y dentro de estos el control de pH, la estrategia de alimentación y el factor de dilución respectivamente. En la concentración por membranas se evaluó el efecto de la presión transmembrana, la velocidad tangencial, el pH de la alimentación y la concentración de sólidos, para esta parte del proceso también debió considerarse el ensuciamiento de la membrana, lo cual claramente afectaría el proceso productivo. Finalmente, para el secado por atomización se partió por estudiar las variables de operación como presión de atomización, temperatura de salida y concentración de sólidos en la alimentación, para seguir con los efectos de estrés térmico, salino y ácido en la resistencia de los microorganismos, luego, se evaluó el potencial de diversas sustancias y mezclas de ellas para su uso en la microencapsulación mediante el secado por atomización. En esta última etapa se consideró además el periodo de almacenamiento de los productos deshidratados, estabilidad que se midió a 4, 25 y 37°C.

De los ensayos en modo discontinuo se encontró que la cepa *Lactobacillus plantarum* LPS47 presentaba una alta tolerancia a ambientes ácidos, lo cual le permitió alcanzar una viabilidad del orden de $\sim 10^9$ UFC/ml independiente si el cultivo se hizo o no con control de pH. En este sentido, lo único que se vio afectado fue la producción de ácido láctico, que pasó de una concentración de 4 g/L (sin control de pH) a 15 g/L en cultivos con control de pH. Los ensayos en modo fed-batch revelaron que dependiendo del sustrato y de la estrategia de la alimentación fue posible fomentar la producción de biomasa o de ácido láctico, fue así como alimentando en forma continua (0.17 ml/min) una mezcla de lactosuero – peptona de caseína se logró una concentración final de 40 g/L de ácido láctico, por otro lado, usando el mismo sustrato pero alimentado en forma intermitente fue posible lograr un aumento en el recuento de microorganismos viables de más de 10 veces con respecto a lo que se tenía al finalizar el cultivo en modo discontinuo. En el caso del cultivo continuo, *L. plantarum* fue capaz de adaptar su tasa

de crecimiento a todos los tiempos de residencia ensayados (entre 4 y 12 horas), la productividad volumétrica de biomasa por su parte fue entre 2 a 6 veces superior a lo que se había encontrado en modo discontinuo, sin embargo, ni la concentración de ácido láctico ni el recuento de microorganismos viables fueron atractivos en comparación a lo que se había encontrado operando en modo fed batch o discontinuo. Fue así, como al finalizar esta etapa y dado el conocimiento cabal que se tenía de la operación, se decidió seguir trabajando en modo discontinuo sin control de pH, sin embargo, se dejó la puerta abierta, para el cultivo fedbatch en pos de seguir investigando su aplicación especialmente en cepas que pudieran ser más restrictivas en términos nutricionales o más delicadas frente a condiciones adversas del medio (e.g. acidez).

Con respecto a la operación de microfiltración, se encontró que los mejores resultados se lograban operando la membrana a una presión transmembrana de 2 bar y a una velocidad tangencial de 4 m/s, sin necesidad de alterar el pH del medio de cultivo (~ 3.8). Bajo las condiciones anteriormente descritas, fue posible aumentar el recuento de bacterias viables en 2.5 veces, ahora bien, la variable que más afectó fue la presencia de peptona de caseína en el medio de cultivo, de hecho, al eliminar este componente se logró aumentar el recuento hasta 4 veces en el concentrado en relación a la alimentación, sin embargo, al no contar el medio de cultivo con este aditivo la concentración bacteriana no alcanzó a llegar a 10^8 UFC/ml, por tanto no resultaba adecuado para la aplicación que se esperaba darle al producto final. Ahora bien, para esta cepa en particular, se encontró que la separación de la biomasa desde el caldo de fermentación no era realmente necesaria dado que la misma se comportaba de buena forma en los pasos siguientes aún en presencia de los metabolitos, sin embargo, el uso de la microfiltración pudiera ser necesaria e incluso mandataria dependiendo del microorganismo con el cual se esté trabajando.

Para finalizar, el secado por atomización fue optimizado en términos de sus variables de operación encontrándose que lo más adecuado en términos de rendimiento ($> 40\%$), humedad ($< 10\%$) y pérdida de viabilidad (< 1 ciclo log) era trabajar con una presión de atomización de 2 bar, una concentración de sólidos de 20%p/p y una temperatura de salida de 70°C , siendo esta última, la variable de operación que más afectó la sobrevivencia de los microorganismos. En la medida que las bacterias fueron cultivadas durante la fase estacionaria de crecimiento, el estrés osmótico no le confirió resistencia adicional durante el secado, no así, el estrés térmico, ya que se comprobó que aumentando la temperatura de cultivo de 25°C a 32°C la pérdida de viabilidad disminuía de 3 a 1.5 ciclos logarítmicos. En forma adicional, el uso de microencapsulación fue positivo y necesario en todos los aspectos, encontrándose

que la mezcla de proteína de suero – glutamato monosódico – sacarosa – sorbitol era capaz de lograr que la pérdida de viabilidad durante la operación fuera incluso de 0.3 ciclos logarítmicos, de la misma forma el uso de esta mezcla protectora permitió mantener la viabilidad durante el almacenamiento a 25°C en atmósfera no controlada durante 30 semanas antes de alcanzar la concentración límite de 10^7 UFC/g.

Una vez obtenido el producto final, se sometió a una serie de pruebas para confirmar la mantención de sus características probióticas, a partir de estos ensayos se encontró que el microorganismo mantenía las mismas propiedades que la cepa fresca en términos de crecimiento, capacidad acidificante y poder de inhibición frente a patógenos (en este caso *Yersinia ruckeri*). Para finalizar entonces, se procedió a hacer pruebas a mayor escala, encontrándose que la producción fue satisfactoria tanto a escala piloto (cultivo de 20 L) como a nivel semi – industrial (120 L) llegando a obtener una concentración de microorganismos del orden de 10^{10} UFC/g.

En conclusión, se ha demostrado la factibilidad técnica y económica de obtener un producto probiótico deshidratado estable mediante la operación conjunta de cultivo en modo discontinuo sin control de pH y secado por atomización en presencia de una mezcla de proteína de suero/glutamato/sacarosa/sorbitol al 20%p/p en proporción 17:1:1:1. El producto fue capaz de mantener una viabilidad comercialmente adecuada ($> 10^7$ UFC/g) por al menos 7 meses a 25°C en un ambiente sin control de humedad. En conjunto con esto, las pruebas realizadas post – secado mostraron que la cepa deshidratada fue capaz de mantener las características de interés tecnológico, que presentaba la cepa fresca, inalteradas.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 Objetivo general.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
3. MARCO TEÓRICO.....	10
3.1 Probióticos.....	10
3.1.1 Aspectos generales.....	10
3.1.2 Rol de probióticos en la acuicultura.....	11
3.1.3 Bacterias ácido lácticas.....	13
3.1.4 <i>Lactobacillus plantarum</i>	13
3.2 Estrategias comunes de cultivo.....	14
3.2.1 Cultivo discontinuo.....	14
3.2.2 Cultivo continuo – quimiostato.....	15
3.2.3 Cultivo fedbatch.....	15
3.2.4 Crecimiento y Producción.....	16
3.3 Microfiltración.....	18
3.4 Estabilización de biomasa.....	20
3.4.1 Secado por atomización.....	20
3.4.1.1 Operación del secador.....	20
3.4.1.2 Variables de operación de interés en el secado por atomización.....	21
3.4.2 Microencapsulación.....	23
3.4.2.1 Aspectos generales.....	23
3.4.2.2 Materiales de encapsulación.....	24
3.4.3 Estrés como forma de aumentar la resistencia durante el secado.....	26
3.4.3.1 Estrés térmico.....	26
3.4.3.2 Estrés salino.....	27
3.4.3.3 Estrés ácido.....	29
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
4.1 Materiales.....	30
4.1.1 Microorganismos.....	30
4.1.2 Medios de activación y cultivo.....	30
4.1.2.1 Caldo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS).....	30
4.1.2.2 Medio tradicional (MT).....	31
4.1.2.3 Caldo CASO (tripticosa).....	31
4.1.2.4 LAPTg.....	31
4.1.3 Otros reactivos y sustancias.....	32
4.1.4 Equipos e Instrumentación.....	33
4.2 Metodologías.....	36
4.2.1 Diagramas de flujo.....	36
4.2.1.1 Diagrama Global.....	36
4.2.1.2 Cultivo.....	36
4.2.1.3 Concentración de biomasa.....	37

4.2.1.4 Estabilización de biomasa	38
4.2.2 Activación	39
4.2.2.1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	39
4.2.2.2 <i>Yersinia ruckeri</i>	39
4.2.3 Preparación del inóculo	39
4.2.3.1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	39
4.2.3.2 <i>Yersinia ruckeri</i>	39
4.2.4 Cultivo	39
4.2.4.1 Preparación medio de cultivo	39
4.2.4.2 Cultivo discontinuo	40
4.2.4.3 Cultivo fed-batch	41
4.2.4.4 Cultivo continuo	41
4.2.5 Concentración de biomasa	42
4.2.5.1 Resistencia de la membrana	42
4.2.5.2 Microfiltración	42
4.2.6 Estabilización mediante secado por atomización	43
4.2.6.1 Operación del secador	43
4.2.6.2 Efecto de las condiciones de operación del secador	43
4.2.6.3 Efecto del estrés durante el cultivo	44
4.2.6.4 Efecto de la centrifugación	44
4.2.6.5 Efecto de los materiales de encapsulación	44
4.2.7 Pruebas de estabilidad post secado	46
4.2.7.1 Cinéticas de crecimiento y acidificación de <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS47	46
4.2.7.2 Resistencia de la cepa a altas temperaturas	46
4.2.7.3 Resistencia de la cepa a condiciones ácidas	47
4.2.7.4 Cinética de inhibición de <i>Yersinia ruckeri</i>	47
4.2.7.5 Estabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> deshidratado durante almacenamiento ...	48
4.2.8 Pruebas a mayor escala	48
4.2.8.1 Ensayo escala piloto	48
4.2.8.2 Ensayo escala semi - industrial	49
4.2.9 Análisis	49
4.2.9.1 Relacionados con el cultivo	49
4.2.9.2 Relacionados con la separación por membranas	51
4.2.9.3 Relacionados con el secado	51
4.2.9.4 Análisis estadístico	53
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
5.1 Selección de cepa probiótica	54
5.2 Modos de Cultivo	55
5.2.1 Cultivo en modo discontinuo	55
5.1.2 Cultivo semicontinuo	58
5.1.3 Cultivo continuo	61
5.1.4 Comentarios finales	63
5.2 Concentración de biomasa	65
5.2.1 Tamaño bacteriano	65
5.2.2 Microfiltración	65
5.2.2.1 Influencia de la presión transmembrana (PTM)	66
5.2.2.2 Influencia de la velocidad tangencial, v	68
5.2.2.3 Efecto del pH	70

5.2.2.4 Efecto concentración de sólidos	71
5.3 Secado y Estabilización de biomasa	72
5.3.1 Condiciones de operación	72
5.3.1.1 Acidez de la alimentación	72
5.3.1.2 Presión de atomización y temperatura	72
5.3.1.3 Contenido de sólidos en la alimentación	74
5.3.2 Efecto de la aplicación de estrés durante el cultivo	75
5.3.2.1 Estrés térmico	75
5.3.2.2 Estrés osmótico	76
5.3.3 Centrifugación del caldo de fermentación	78
5.3.4 Estudio del efecto de materiales encapsulantes en la viabilidad de <i>L. plantarum</i>	80
5.3.4.1 Comportamiento de <i>Lactobacillus plantarum</i> estresado osmóticamente durante el cultivo	80
5.3.4.2 Efecto de la inclusión de mayor porcentaje de proteínas en el medio protector.....	86
5.3.4.3 Presencia de azúcares en el medio de protección.....	88
5.3.4.4 Presencia de glutamato monosódico en el medio de protección.....	91
5.3.4.5 Presencia de sorbitol en el medio de protección.....	92
5.3.5 Pruebas de estabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> post – secado	94
5.3.5.2 Cinéticas de crecimiento y acidificación	97
5.3.5.3 Resistencia a altas temperaturas	98
5.3.5.4 Resistencia a ambientes ácidos	100
5.3.5.5 Inhibición de la cepa patógena <i>Yersinia ruckeri</i>	101
5.4 Pruebas a mayor escala	104
5.4.1 Ensayos escala piloto.....	104
5.4.2 Ensayo escala semi - industrial	105
6. CONCLUSIONES.....	106
7. REFERENCIAS	109
APÉNDICES	120
A. Lavado de membranas.....	120
B. Procedimiento de secado por atomización	121
C. Composición aproximada de soluciones de sales saturadas.....	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Composición del MRS	30
Tabla 4.2. Composición caldo CASO.....	31
Tabla 4.3. Composición LAPTg.....	31
Tabla 4.4. Lista de reactivos y sustancias misceláneas usadas en los experimentos.....	32
Tabla 4.5. Composición de sustratos usados en cultivos en modo fedbatch. Valores en g por 100 ml.	41
Tabla 4.6. Condiciones de operación para ensayos de microfiltración.....	42
Tabla 4.7. Condiciones de secado por atomización de <i>Lactobacillus plantarum</i>	43
Tabla 4.8. Concentración en g/L de sustancias usadas como protección en el caldo de fermentación centrifugado como preparación para el secado por atomización de <i>Lactobacillus plantarum</i>	45
Tabla 4.9. Concentración g/L de sustancias usadas como protección en el caldo de fermentación sin centrifugar como preparación para el secado por atomización de <i>Lactobacillus plantarum</i>	45
Tabla 4.10. Protocolo de toma de muestras para evaluar resistencia térmica de <i>L. plantarum</i> autóctono.....	47
Tabla 5.1. Resumen de variables de interés productivo en cultivo en modo discontinuo de <i>L. plantarum</i> LPS 47 asociado a las operaciones con y sin control de pH.....	57
Tabla 5.2. Resumen de variables de interés productivo en cultivo en modo fedbatch de <i>L. plantarum</i> LPS 47 para distintos sustratos y estrategias de alimentación.....	60
Tabla 5.3. Resumen de variables de interés productivo en cultivo en modo continuo de <i>L. plantarum</i> LPS 47 para distintos tiempos de residencia. Concentración inicial de glucosa 16 g/L. Los valores informados corresponden una vez alcanzado el estado estacionario.....	61
Tabla 5.4. Reducción de la densidad de flujo en función de la presión transmembrana.....	67
Tabla 5.5. Factor de concentración (F_c) en el recuento de microorganismos viables en función de PTM.....	68
Tabla 5.6. Reducción de la densidad de flujo en función de la velocidad tangencial.....	68
Tabla 5.7. Factor de concentración de biomasa (recuento de microorganismos viables) en función de la velocidad tangencial.....	70
Tabla 5.8. Rendimiento y humedad de <i>L. plantarum</i> LPS 47 secado por atomización con (70°) y sin centrifugación (SC70°) del caldo de fermentación.....	78

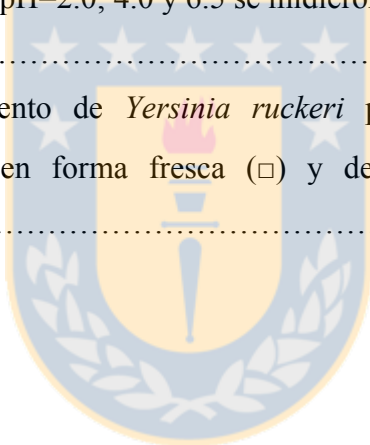
Tabla 5.9. Resultados secado por atomización <i>Lactobacillus plantarum</i> autóctono. BD: Antes del secado, AD: Después del secado, CD: Evaluación daño membrana celular. Todos los valores en log UFC/g.....	82
Tabla 5.10. Conteo microorganismos viables de <i>Lactobacillus plantarum</i> autóctono a los 70 días de almacenamiento a 4°C. Todos los valores en log UFC/g.....	83
Tabla 5.11. Parámetros del modelo BET ajustado a los datos experimentales para producto probiótico en base a LPS 47 almacenado a 25°C en presencia de WPGF y WPGS.....	90
Tabla 5.12. Tiempo de vida de estante ($N=10^7$ UFC/g) para <i>L. plantarum</i> secado por atomización en presencia de WPS y WPGS a distintas temperaturas de almacenamiento. Valores dados en semanas.....	91
Tabla 5.13. Tiempo de vida de estante ($N=10^7$ UFC/g) para <i>L. plantarum</i> secado por atomización en presencia de WPGSSo, comparación con WPGS a distintas temperaturas de almacenamiento. Valores dados en semanas.....	93
Tabla 5.14. Parámetros del modelo BET ajustado a los datos experimentales para producto probiótico deshidratado de LPS 47 y encapsulado en WPGSSo. Almacenamiento a 25° y 37°C....	95
Tabla 5.15. Resultados obtenidos para la formulación de producto probiótico usando <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47 como principio activo. Escala piloto.....	104
Tabla 5.16. Resultados obtenidos para la formulación de producto probiótico usando <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47 como principio activo. Escala semi – industrial.....	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Principio de la filtración por flujo cruzado.....	18
Figura 3.2. Dinámica del crecimiento del depósito de sólidos y su efecto en el flux (v_F).	19
Figura 3.3. Esquema de una instalación de Secado por atomización.....	20
Figura 5.1. Cinética de crecimiento (\circ) y perfiles de concentración de glucosa (\square) y ácido láctico (\blacktriangle) de <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47 cultivada en modo discontinuo sin control de pH.....	55
Figura 5.2. Cinética de crecimiento (\circ) y perfiles de concentración de glucosa (\square) y ácido láctico (\blacktriangle) de <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47 cultivada en modo discontinuo con control de pH.....	56
Figura 5.3. Perfiles de concentración de biomasa para <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47 cultivada en modo fedbatch.....	58
Figura 5.4. Evolución de la viabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47 cultivado en modo fedbatch relativo a la viabilidad al finalizar el modo batch (N_{24}).	59
Figura 5.5. Comportamiento de la concentración de biomasa de <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47 cultivado en modo continuo en función del factor de dilución.....	62
Figura 5.6. Fotografía SEM de <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47.....	65
Figura 5.7. Determinación de la presión transmembrana crítica (PTM_c) durante la filtración de <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47 en medio PL a una velocidad tangencial de 4 m/s.....	66
Figura 5.8. Evolución del flux en el tiempo en función de la PTM aplicada y una velocidad de 4 m/s.....	67
Figura 5.9. Concentración de microorganismos viables en la alimentación y en la corriente del concentrado después de 80 minutos de operación.....	68
Figura 5.10. Evolución del flux en el tiempo en función de la velocidad tangencial aplicada. $PTM = 2$ bar.....	69
Figura 5.11. Evolución del flux en el tiempo en función del pH de la alimentación. $PTM = 2$ bar, $v = 4$ m/s.	70
Figura 5.12. Efecto de la presión de atomización (\bullet) y la temperatura de salida (\square) en la supervivencia de <i>Lactobacillus plantarum</i> autóctono inmediatamente después del secado. N : Conteo bacteriano justo después del secado, N_0 : Conteo bacteriano antes del secado.	73

Figura 5.13. Efecto del estrés térmico durante el cultivo de <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47. En ambos casos las bacterias fueron resuspendidas sólo en suero fisiológico previo a la operación de secado. BD: Antes del secado, AD: Después del secado, CD: Daño en la membrana celular...	75
Figura 5.14. Efecto del estrés osmótico durante el cultivo de <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47. El cultivo se llevó a cabo a 32°C y se usó lactosuero (20% p/p) como material de encapsulación. BD: Antes del secado, AD: Después del secado, CD: Daño en la membrana celular.....	77
Figura 5.15. Efecto de la centrifugación del caldo de fermentación en la resistencia de <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47 frente al secado por atomización. El cultivo se llevó a cabo a 32°C y se usó lactosuero (20% p/p) como material de encapsulación. BD: Antes del secado, AD: Después del secado, CD: Daño en la membrana celular.....	79
Figura 5.16 Porcentaje de supervivencia de <i>Lactobacillus plantarum</i> antes del secado (BD), inmediatamente después del secado (AD) y daño en la membrana celular (CD) en presencia de distintos materiales de protección. W=Lactosuero; WM=Lactosuero – Maltodextrina; SM=Leche descremada – Maltodextrina; WMG=Lactosuero – Maltodextrina – Goma arábica; WMP=Lactosuero – Maltodextrina – Pectina; 32°= Bacterias resuspendidas en suero fisiológico, sin protección.	80
Figura 5.17 . Cinéticas de inactivación durante el almacenamiento de <i>Lactobacillus plantarum</i> encapsulado en lactosuero (W) y Proteína de suero (WP) a 25°C (○,●) y 37°C (□, ■).	86
Figura 5.18. Fotografías SEM de <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47 secado por atomización en presencia de Lactosuero (A) y Proteína de suero (B), ambas en concentración 20% p/p.....	87
Figura 5.19. Cinéticas de inactivación durante el almacenamiento de <i>Lactobacillus plantarum</i> encapsulado en Proteína de suero – Fructosa (WPF) y Proteína de suero – Sacarosa (WPS) a 25°C (○,●) y 37°C (□, ■).....	88
Figura 5.20. Isotherma de adsorción de <i>L. plantarum</i> encapsulado en WPF (●) y WPS (■) a 25°C.....	90
Figura 5.21. Estabilidad al almacenamiento de <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47 secado por atomización en presencia de Proteína de Suero – Sacarosa (WPS) y Proteína de Suero – Sacarosa – Glutamato (WPGS).....	91
Figura 5.22. Estabilidad al almacenamiento de <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47 secado por atomización en presencia de Proteína de Suero – Sacarosa (WPS) y Proteína de Suero – Sacarosa – Glutamato (WPGS) y Proteína de Suero – Sacarosa – Glutamato – Sorbitol (WPGSSo).....	93

Figura 5.23. Isoterma de adsorción de <i>L. plantarum</i> encapsulado en WPGSSo a 25°C (■) y 37°C (□).....	94
Figura 5.24. Fotografías SEM de <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47 secado por atomización a una temperatura de salida de 70°C y en presencia de material encapsulante WPGSSo.....	95
Figura 5.25. Distribución de tamaño de partícula para LPS 47 secado por atomización en presencia de WPGSSo.....	96
Figura 5.26. (A) Cinéticas de crecimiento y (B) Cinéticas de acidificación de <i>Lactobacillus plantarum</i> autóctono en sus formas fresca (○) y deshidratada (◇).....	97
Figura 5.27 Curvas de mortalidad a 40°C (A), 50°C (B), 55°C (C) y 60°C (D) para <i>Lactobacillus plantarum</i> autóctono en sus formas fresca (○) y deshidratada (□).....	99
Figura 5.28. Efecto del pH en la supervivencia de <i>Lactobacillus plantarum</i> autóctono microencapsulado con Proteína de suero – Glutamato – Sacarosa – Sorbitol (WPGSSo). Los porcentajes que se muestran para los pH=2.0; 4.0 y 6.5 se midieron 4 horas después de inoculada la cepa.....	100
Figura 5.29. Cinética de crecimiento de <i>Yersinia ruckeri</i> pura (○) y en presencia de <i>Lactobacillus plantarum</i> LPS 47 en forma fresca (□) y deshidratada (Δ). Material de encapsulación: WPGSSo.....	102



1. INTRODUCCIÓN

Las exportaciones de salmones y truchas chilenos están posicionadas en un importante segundo lugar a nivel internacional justo después de Noruega, alcanzando 2890 millones de dólares durante el último año 2012 (Chilealimentos, 2013). Los salmones de exportación son productos de alta calidad y las industrias salmoneras evitan la aparición de enfermedades oportunistas causadas por patógenos como *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida* y *Yersinia ruckeri*, usando profilaxis sanitaria, desinfección y quimioterapia. Ésta última representada principalmente por antibióticos (Ringo *et al.* 2010), cuyo uso nacional se había estimado (al año 2008) en 630 ton/año (Millanao *et al.* 2011). Concientes de los problemas asociados a este tipo de sustancias (entre ellas la resistencia), existe un gran interés en encontrar una vía natural de proteger la industria y a las distintas especies, asegurando un producto libre de enfermedad y/o restos de sustancias indeseables. En los últimos años, una gran variedad de trabajos ha sugerido que los problemas en la acuicultura, así como en otras poblaciones animales, podrían ser minimizados mediante el uso de probióticos (Gatesoupe *et al.* 2007).

Tal como plantea Ringo (2010), los mecanismos de acción de los probióticos incluyen la producción de sustancias inhibitorias tales como ácidos orgánicos y bacteriocinas, y competición por nutrientes esenciales o enzimas. Kesarcodi-Watson (2005), agrega además la competición por sitios de adhesión, alteraciones en la actividad enzimática de los patógenos, funciones inmunoestimulantes y beneficios nutricionales, tales como mejorar la digestibilidad y la utilización del alimento. Como agentes probióticos se han usado ampliamente algunas especies de bacterias ácido lácticas (LAB, por sus siglas en inglés) y bifidobacterias, principalmente en humanos y otros animales terrestres, en base a esto, recientemente, varios trabajos se han enfocado en el uso de probióticos como reguladores del desarrollo de las larvas, su crecimiento y supervivencia durante las primeras semanas de vida como pez, todo esto, siendo incorporados, por ejemplo, en una formulación alimenticia (Toledo *et al.* 2010).

La producción de probióticos tiene como primera etapa la selección de cepas, una vez cumplido con esto se debe hacer un estudio completo sobre los requerimientos nutricionales del microorganismo en cuestión, sólo después de esto se puede empezar a evaluar el modo de cultivo y escoger el que mejor se ajuste a nuestras necesidades y recursos, aunque la variable dominante en este caso es el tener un cultivo con una alta concentración celular. Posterior a ello y si es necesario, se debe pensar en las labores de separación y concentración y ante eso se deben evaluar las alternativas posibles y verificar que las mismas cumplan con su labor ocasionando el mínimo daño a los microorganismos, pero sin

descuidar tampoco la calidad de la separación y la mantención de las condiciones lo más asépticas posibles a fin de asegurar un producto final de calidad.

Una vez que se tiene una concentración adecuada de bacterias se debe encontrar la forma de aumentar la estabilidad de la biomasa. Las bacterias probióticas en su mayoría son comercializadas en forma congelada o deshidratada, siendo esta última comúnmente obtenida mediante liofilización. El problema de esta última surge cuando queremos o necesitamos una mayor producción. De forma de reducir los tiempos y los costos de energía asociados a este proceso, muchos autores han recomendado el uso del secado por atomización como la alternativa más adecuada para altas velocidades de producción con un costo que puede llegar a ser 80% más bajo que el proceso de liofilización (Desmond *et al.* 2002; Varsha *et al.* 2011).

Con respecto a la calidad del producto final obtenido a partir de secado por atomización, las condiciones de operación del mismo, así como las condiciones de la alimentación, parecieran ser las variables más influyentes. Los parámetros de proceso estudiados incluyen: patrones de flujo del aire (co-corriente, contracorriente, flujo mixto), presión de atomización, tiempo de residencia, velocidad de alimentación y temperaturas de entrada y salida (Telang y Thorat, 2011; Yu *et al.* 2007). De todas éstas, se ha reportado que la temperatura de salida es parámetro que más afecta la viabilidad de los microorganismos (Peighamardoust *et al.* 2011, van de Guchte *et al.* 2002; Silva *et al.* 2011), aunque Telang y Thorat (2011) también reportan cierta influencia de la velocidad de flujo de alimentación en la viabilidad final del producto.

Aunque el secado por atomización tiene como mayor desventaja la pérdida de viabilidad asociada a la inactivación térmica y por deshidratación (Corcoran *et al.* 2004), la microencapsulación mediante secado por atomización ha demostrado reducir en un alto porcentaje el impacto de las altas temperaturas sobre los microorganismos, y comparado con otras técnicas de microencapsulación, el secado por atomización ofrece la ventaja de ser un proceso continuo y flexible (Silva *et al.* 2011).

En la microencapsulación mediante secado por atomización, la biomasa es homogenizada con el material de transporte (el cual puede incluir carbohidratos, polímeros, gomas, lípidos o mezclas de dos o más de estas sustancias). De acuerdo a lo señalado por Desai y Park (2005), la composición del material encapsulante será el principal determinante de las propiedades funcionales de la microcápsula. Una vez que se ha logrado una suspensión homogénea, la misma es alimentada al secador y atomizada

a través de una boquilla. Durante su paso por el secador, el agua es evaporada y las microcápsulas son recolectadas desde el fondo del secador y/o desde la parte baja del ciclón (Desai y Park, 2005; Ré, 1998).

Sumado a la microencapsulación, la pre-adaptación a niveles no letales de estrés también ha sido estudiada como forma de reducir la mortalidad durante el secado por atomización (Kets *et al.* 1996; Gibbs *et al.* 1999) investigándose principalmente la exposición a tres tipos de estrés: ácido, térmico y salino (Csonka, 1989). En todos ellos, la forma en la cual la bacteria es capaz de protegerse a sí misma está relacionada con la sobre-expresión de proteínas de choque térmico, y en algunos casos, con la producción y asimilación de solutos compatibles (Kim *et al.* 2001). Con respecto a estos últimos se ha encontrado que están especialmente relacionados con el estrés salino (osmótico), aunque su acumulación no toma lugar rápidamente, de ahí que se haya recomendado promover su producción y/o acumulación el algún paso previo al secado propiamente tal (Riveros *et al.* 2009). El estrés térmico, que involucra la exposición de la bacteria a temperaturas por debajo de aquellas que pudieran causarle la muerte, ha sido usado satisfactoriamente en una variedad de microorganismos probióticos donde se ha observado que no sólo ha existido producción de las proteínas anteriormente mencionadas, sino también que se han producido cambios a nivel de la membrana celular, principalmente relacionados con la saturación y el largo de las cadenas de ácidos grasos de los cuales está compuesta y que son los responsables de mantener la fluidez de la membrana a un nivel óptimo (Meng *et al.* 2008).

En virtud de todos los antecedentes anteriormente expuestos este trabajo plantea la necesidad de evaluar un proceso que permita la obtención a gran escala de un producto probiótico deshidratado estable haciendo uso de todas las herramientas disponibles (estrés, concentración, uso de sustancias protectoras, secado por atomización) a fin de lograr un producto con una viabilidad de a lo menos 10^8 UFC/g y que sea capaz de mantener las propiedades de interés tecnológico, por las que inicialmente fue seleccionado, inalteradas durante un almacenamiento de a lo menos 6 meses a temperatura ambiente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Estandarizar el proceso y las condiciones de operación para la formulación de un producto probiótico deshidratado estable de viabilidad igual o superior a 10^8 UFC/g cuyo principio activo sea una cepa *Lactobacillus plantarum* autóctona.

2.2 Objetivos específicos

- i. Contrastar los distintos modos de operación del bioreactor (discontinuo, semicontinuo y continuo) e identificar cual de ellos permite obtener biomasa con una viabilidad igual o superior a 10^9 UFC/ml al finalizar la etapa de cultivo.
- ii. Determinar las condiciones óptimas de operación para una membrana de microfiltración Carbosep M14 en términos de presión transmembrana, velocidad tangencial y pH de forma de asegurar un producto concentrado de alta viabilidad y una línea de permeado libre, en lo posible, de bacterias.
- iii. Evaluar la influencia de los parámetros: presión de atomización, temperatura de salida del secador, porcentaje de sólidos y pH de la alimentación, en la operación de secado por atomización y la viabilidad bacteriana.
- iv. Establecer el efecto que tiene el uso de estrés osmótico ejercido durante toda la etapa de cultivo en la resistencia de *Lactobacillus plantarum* autóctono durante el secado por atomización y el almacenamiento en atmósfera no controlada.
- v. Comparar el uso de diferentes materiales de protección en la microencapsulación de *Lactobacillus plantarum* mediante secado por atomización, evaluar su comportamiento en función del rendimiento y de la estabilidad al almacenamiento.
- vi. Demostrar que el comportamiento de la cepa deshidratada es el mismo en términos de crecimiento, acidificación y capacidad inhibitoria que el exhibido por la cepa fresca.
- vii. Especificar forma, tamaño y mojabilidad del producto deshidratado obtenido a partir de la operación de secado por atomización. Mostrar isotermas de adsorción a fin de establecer bajo que condiciones de humedad el almacenamiento se hace más efectivo.
- viii. Establecer la factibilidad técnica del proceso realizando ensayos a escala piloto y semi – industrial.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Probióticos

3.1.1 Aspectos generales

La palabra probiótico se deriva del griego que significa “pro-vida” y sin bien ha tenido muchas definiciones a lo largo del tiempo, actualmente la más reconocida es la de la FAO (2001) que define a los probióticos como: microorganismos vivos que administrados en la dosis adecuada confieren beneficios al huésped. Estos beneficios pueden verse reflejados tanto a nivel gastrointestinal, respiratorio como urogenital (Mosilhey, 2003). Si bien en la definición no se mencionan cantidades específicas a administrar, se ha reportado que una dosis diaria mayor o igual a 10^9 UFC es adecuada, para ello, las bacterias probióticas deben estar en una concentración entre $10^6 - 10^7$ UFC/g (Kosin, 2006; Meng, 2008).

Los probióticos son usados se encuentran principalmente en leche, yogurt y quesos, sin embargo, también se comercializan en forma de suplementos dietéticos. De acuerdo a Mosilhey (2003) los beneficios asociados al consumo de probióticos pueden ser divididos en nutricionales y terapéuticos. Los primeros incluyen el aumento en la biodisponibilidad de calcio, zinc, hierro, manganeso, cobre y fósforo, incrementando la digestibilidad de proteínas y la síntesis de vitaminas. Los efectos terapéuticos por otro lado incluyen el tratamiento de diversos desórdenes gastrointestinales, colesterol elevado, intolerancia a la lactosa, reducción de factores de riesgo de cáncer, alivio de síntomas de alergia alimentaria en niños e inmunomodulación (Meng, 2008).

La mayoría de las bacterias probióticas pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Los criterios de selección para la selección de cepas probióticas son bastante rigurosos, esto a fin de que se alcancen los efectos positivos esperables. De acuerdo a Kosin (2006) la selección de probióticos pasa por los siguientes criterios:

Bioseguridad: Los microorganismos de deben ser considerados como GRAS (Generally recognized as safe).

Origen: Las cepas deben ser aisladas preferentemente de la microflora del huésped en el cual se va a utilizar.

Resistencia: Después de su administración los probióticos deben ser capaces de resistir el ataque de los mecanismos de defensa del huésped y las condiciones ambientales existentes.

Adherencia y colonización: Se deben considerar todos los factores que pudieran afectar la colonización lo cual implica la resistencia del microorganismo propiamente tal, las condiciones ambientales y la interacción con otros microorganismos existentes.

Actividad antimicrobiana: Los microorganismos usados como probióticos deben manifestar propiedades antagónicas como ser disminución del pH, producción de sustancias antagónicas como por ejemplo ácidos, peróxido de hidrógeno o bacteriocinas, consumo de nutrientes disponibles, reducción del potencial redox, competencia por lugares de adhesión, entre otras.

Inmunomodulación: Los probióticos pueden influenciar el sistema inmune a partir de metabolitos, componentes de la pared celular y ADN. De hecho, la sola interacción de los probióticos con las células del huésped debe desencadenar una cascada de señalizaciones que conducirá finalmente a la inmunomodulación (Oelschlaeger, 2010).

Viabilidad/supervivencia y resistencia durante el procesamiento: Los microorganismos deben ser capaces de sobrevivir a todas y cada una de las etapas de producción, esto es, cultivo, separación, procesos de estabilización y almacenamiento.

Gran parte de estos puntos fue validado antes o durante la realización de los experimentos destinados al cultivo, concentración y/o estabilización de la cepa en estudio.

3.1.2 Rol de probióticos en la acuicultura

Dado que la acuicultura se ha convertido en una actividad económica importante, en varios países la producción a gran escala ha traído consigo el hecho que los animales acuáticos se encuentren expuestos a situaciones de gran estrés que finalmente se traducen en enfermedades (producidos por microorganismos del tipo *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophyla*, *Aeromonas salmonicida*, *Streptococcus focae*, *Micrococcus luteus*, *Vibrio anguillarum*, *F. psychrophilum* entre otros) y deterioro de las condiciones ambientales, lo cual a corto o largo plazo se traduce en pérdidas económicas (Gatesoupe *et al.* 2007).

Lamentablemente, y con el fin de evitar la aparición de enfermedades oportunistas ha existido un incremento considerable en el uso de medidas profilácticas cuyos principales representantes son los antibióticos (Balcazar *et al.* 2006), sólo en nuestro país dicho consumo alcanza las 550 ton/año (Cabello, 2006), en la Unión Europea llega a 1600 ton/año y en Estados Unidos a 12600 ton/año. El principal problema asociado al uso de antibióticos radica en que los mismos han generado gran resistencia bacteriana, dado que los microorganismos patógenos han encontrado la forma de adaptarse a la presencia del agente a partir de mutaciones cromosómicas o adquisición de plásmidos, siendo esta

última bastante peligrosa ya que permite la transferencia de resistencia de una bacteria a otra rápidamente (Balcazar *et al.* 2006).

Bajo este escenario, existe un interés creciente en encontrar una forma natural e inocua de proteger a las especies involucradas asegurando un producto libre de enfermedad y/o trazas de sustancias indeseables. En los últimos años, las investigaciones sugieren que así como se ha documentado las ventajas del uso de probióticos en humanos y otros animales terrestres, también los problemas en la acuicultura podrían ser remediados haciendo uso de estos microorganismos beneficiosos (Gatesoupe, 2007; Kesarcodi-Watson, 2008; Ringo *et al.* 2010).

De acuerdo a Balcazar (2006) las cepas probióticas han sido aisladas principalmente de la microbiota indígena y exógena de animales acuáticos. En cuanto a los mecanismos de acción, se han reportado (i) exclusión de bacterias patógenas por competición, (ii) fuente de nutrientes y contribución enzimática a la digestión, (iii) captación directa de material orgánico disuelto mediado por la bacteria, (iv) mejoramiento de la respuesta inmune contra microorganismos patógenos y (v) efectos antivirales (Balcazar *et al.* 2006; Kesarcodi-Watson, 2008; Ringo, 2010).

La mayoría de los microorganismos usados para estos fines pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Vibrio*, *Bacillus* o al género *Pseudomonas* y pueden hacerse llegar al huésped o a su ambiente de diversas formas: adición vía alimento vivo, adición al agua de cultivo y/o adición vía dieta artificial.

En relación a los efectos de la incorporación de probióticos, se ha reportado que han sido usados como reguladores del desarrollo de las larvas y como protectores y promotores del crecimiento y desarrollo de los peces durante sus primeras semanas de vida (Gatesoupe, 2008; Kesarcodi-Watson, 2008). Sumado a esto último existe bastante evidencia *in vitro* e *in vivo*, sobre el efecto de bacterias ácido lácticas como agentes anti patógenos en peces juveniles y adultos (Kesarcodi-Watson, 2008; Rosas *et al.* 2012). Aún así, y sin perjuicio de esto último, Titus (2012) señala que la evidencia de beneficios de las bacterias ácido lácticas en peces es aún débil y la principal razón para esto señala que es el exigente ambiente nutricional que necesitarían las mismas para su óptimo crecimiento y junto con esto, especula que ciertos tratamientos que pudieran hacerse al agua (e.g. ozonización) pudieran afectar la viabilidad de las bacterias ácido lácticas presentes en el medio, lo cual impediría que las mismas fueran capaces de alcanzar de forma exitosa el tracto gastrointestinal de los peces (Titus, 2012). A partir de estas mismas observaciones Rosas *et al.* (2012) sugieren que es de gran interés el estudio de la encapsulación

como vía de proteger bacterias probióticas destinadas al consumo animal, lo cual es uno de los temas relevantes de lo cual trata este trabajo.

3.1.3 Bacterias ácido lácticas

Filogenéticamente, las bacterias ácido lácticas pertenecen al grupo de bacterias Gram positivas, y se caracterizan por ser microorganismos no móviles, no formadores de esporas, catalasa-negativos, aerotolerantes y capaces de fermentar hexosas a ácido láctico como producto principal (Mozzi *et al.* 2010). Especies típicas representativas de las bacterias ácido lácticas incluyen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc*.

Bioquímicamente, las bacterias ácido lácticas pueden ser clasificadas principalmente en dos grupos: homofermentativas y hétérofermentativas, estas últimas son capaces de producir, aparte de ácido láctico, otros productos como ácido acético, etanol, dióxido de carbono y ácido fórmico (Salminen, 1993; Mozzi *et al.* 2010).

De por sí, las bacterias ácido lácticas son un grupo bastante heterogéneo, lo cual les permite sobrevivir en varios nichos ecológicos. Se pueden encontrar en leche y otros productos lácteos, plantas, cereales e incluso productos cárnicos (Adamberg, 2003). Muchas de estas especies son utilizadas en la manufactura y preservación de alimentos, donde la presencia de estas bacterias contribuyen en las propiedades organolépticas, reológicas y/o nutricionales de los productos fermentados (Vereecken, 2002; Leroy and de Vuyst, 2004). Las bacterias lácticas se encuentran también formando parte de la microbiota gastrointestinal y/o genitourinaria de humanos y animales, en estos ambientes, las bacterias juegan un rol esencial, promoviendo funciones como inmunomodulación, cuidado del intestino y resistencia contra patógenos. Es debido a estas características que estas especies son usadas tradicionalmente como probióticos y agregadas a preparados alimenticios para crear alimentos funcionales (Mosilhey, 2003; Mozzi *et al.* 2010).

La explotación comercial de este tipo de bacterias, tanto como cultivos iniciadores así como cultivos probióticos es económicamente muy significativo, de ahí que las investigaciones realizadas en genética, fisiología y aplicaciones tecnológicas hayan crecido en los últimos 25 años (Mozzi *et al.* 2010).

3.1.4 *Lactobacillus plantarum*

Esta bacteria es una especie importante en la fermentación de diversos productos vegetales, y es conocida por producir sustancias antimicrobianas, por ejemplo el plantaricin, que es un activo agente

contra ciertos patógenos (Cebeci y Gurakan, 2003). *L. plantarum* es el inóculo para la producción de ácido láctico más común en el ensilaje (proceso de fermentación láctica que se realiza para preservar el forraje almacenado); como un inoculante del ensilaje no sólo acentúa la recuperación de la materia seca sino que a menudo el desempeño animal es también incrementado. Así las cepas *L. plantarum* han comenzado a ser vendidas en mercado como un valioso probiótico, en particular por su adherencia en las células gastrointestinales. Estudios en que se simula el ambiente que las bacterias encontrarán al interior de un pez, ya han demostrado que si se administra el *L. plantarum* en las dosis adecuadas ($>10^8$ UFC/día) éste cumple con su función probiótica (Son *et al.* 2009).

3.2 Estrategias comunes de cultivo

Una vez que una determinada cepa o conjunto de cepas es seleccionada por sus características probióticas, el paso siguiente consiste en el cultivo. Dentro de las formas en que el cultivo puede llevarse a cabo están el modo discontinuo (batch), el modo continuo y el semicontinuo (o fedbatch). El uso de uno u otro estará determinado principalmente por las características del microorganismo y también por lo que se desea privilegiar, es decir, si se desea fomentar la producción de biomasa o bien la producción de un metabolito.

3.2.1 Cultivo discontinuo

Tal como señalan Bailey and Ollis (1986), muchos procesos bioquímicos involucran el crecimiento en modo discontinuo de las células. En esta operación, a un medio líquido (o sólido) se agrega un inóculo de células vivas y nada (a excepción de algún gas y/o antiespumante) se agrega o retira del recipiente hasta que el proceso es finalizado. Como es de esperar, la concentración celular, de nutrientes y productos varía con el tiempo.

La ventaja de este modo de operación radica principalmente en la sencillez de su implementación, sin embargo, posee también serias desventajas como ser el hecho que al finalizar el proceso las células al interior del reactor poseen una distribución de edades (Lucca, 1993), existen problemas de limitación de nutrientes, baja densidad celular, baja productividad y acumulación de toxinas (Dorka, 2007). Dependiendo del microorganismo podrá existir mayor o menor grado de inhibición en relación a el o los metabolitos formados durante la fermentación (e.g. Amrane, 1999). En términos de productividad debe de tomarse en cuenta no solo el tiempo requerido para la fermentación, si no también el tiempo necesario para vaciar el reactor, lavarlo y prepararlo para un nuevo cultivo.

El uso de modo discontinuo para el cultivo de bacterias ácido lácticas ha sido ampliamente documentado para la producción de biomasa (Aguirre, 2010), validación de modelos matemáticos (Monteagudo *et al.* 1996; Amrane, 2001; Schepers *et al.* 2002), optimización de medios de cultivo (Arasaratnam, 1996; Goksungur *et al.* 1997; Demirci, 1998; Fitzpatrick, 2001), optimización de condiciones de cultivo (Kulozik y Wilde, 1999; Guyot *et al.* 2000; Garro *et al.* 2004; Marcobal *et al.* 2006), producción de ácido láctico (Burgos-Rubio, 2000; Elezi *et al.* 2003; Buyukkileci y Harsa, 2004;), y producción de bacteriocinas y/o sustancias afines (Shimizu *et al.* 1999; Guerra, 2001; Garneau, 2002; Liu *et al.* 2004; Vazquez *et al.* 2005).

3.2.2 Cultivo continuo – quimiostato

De acuerdo a Lucca (1993) el cultivo continuo de microorganismos tiene, al igual que el cultivo discontinuo, gran aplicación en la biotecnología. Si bien los primeros experimentos se llevaron a cabo en la década de los 50's no fue sino hasta 1975 cuando este modo de operación adquirió mayor importancia. En términos sencillos, durante el tiempo que dura la operación el reactor se alimenta continuamente con sustrato y a fin de mantener el volumen constante se va retirando, también continuamente, una cantidad de líquido del reactor. La agitación permanente permite que el sistema sea homogéneo, por tanto, en cualquier parte del reactor la concentración celular, de sustrato y de productos metabólicos será la misma.

En comparación al cultivo en modo discontinuo durante el cultivo continuo es posible alcanzar alta densidad celular y alta productividad sin limitaciones de sustrato o inhibición de crecimiento debido a la acumulación de toxinas y/o metabolitos (Dorka, 2007). En cuanto a las desventajas, se menciona el hecho de que dependiendo de las condiciones de operación (tiempo de residencia) podría haber pérdida importante de sustrato en la descarga y que si bien en teoría un reactor en modo continuo es capaz de funcionar por largos periodos de tiempo, en la práctica esto último no es siempre válido dado que a mayor tiempo de operación mayor probabilidad de que surjan problemas de contaminación o de mutación de los microorganismos.

3.2.3 Cultivo fedbatch

En este modo de operación el sustrato es alimentado continua o semi-continuamente, mientras el efluente es removido en forma discontinua. La operación fedbatch combina las ventajas de los modos discontinuo y continuo y a su vez minimiza las desventajas que estos poseen. De acuerdo a Dorka (2007), al igual que en la operación discontinua, el cultivo fedbatch es fácil de implementar y escalar,

al mismo tiempo, se asegura una alta densidad celular y formación de producto debido a la extensión del tiempo de trabajo lo cual se debe a que la alimentaciones capaz de reemplazar los nutrientes agotados y por otro lado diluir el caldo de fermentación, lo cual promueve el crecimiento y alivia los efectos adversos que pudiera tener la acumulación desmedida de metabolitos en el crecimiento celular. Esto implica que en este modo de cultivo las células son mantenidas en una fase estacionaria aparente, mucho más larga que en un cultivo en modo discontinuo.

Dentro de las ventajas, el cultivo fedbatch permite ejercer control sobre la producción de subproductos ya que es posible limitar la provisión de sustratos escogiendo sólo aquellos necesarios para la formación del producto principal. Además, es posible reponer el agua perdida por evaporación durante la operación. Dentro de las desventajas se debe tener cuidado, al igual que en el cultivo discontinuo, con la acumulación de metabolitos que pudieran llegar a niveles inhibitorios, por otro lado se debe cuidar que otros nutrientes, no incorporados en el medio de alimentación, pudieran volverse limitantes.

3.2.4 Crecimiento y Producción

El crecimiento y la formación de productos son procesos de bioconversión en los cuales los nutrientes alimentados al fermentador son convertidos en biomasa y metabolitos. A continuación se presentan las ecuaciones del balance de materia para el crecimiento bacteriano, la utilización de sustrato y la formación de productos en un proceso de fermentación discontinua.

Para el crecimiento se tiene

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3.1)$$

Utilización de sustrato

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{XS}} + mX \quad (3.2)$$

La ecuación 3.2 puede reordenarse para obtener

$$q_s = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} = \frac{\mu}{Y_{XS}} + m \quad (3.3)$$

En la ecuación 3.3 q_s corresponde a la tasa específica de utilización de sustrato, mientras que Y_{XS} representa el máximo rendimiento para el crecimiento celular corregido según los requerimientos de energía para funciones de mantenimiento. Los procesos de mantenimiento son aquellos en los que se consume energía sin que se produzca directamente un incremento de biomasa, pero que sin embargo son necesarios para el crecimiento y sobrevivencia del cultivo, dentro de estos procesos se encuentran: el

recambio de materiales celulares, la movilidad celular, el mantenimiento de los gradientes de concentración entre la célula y el entorno, entre otros.

En forma análoga para la formación de productos se tiene

$$q_p = \frac{1}{X} \frac{dp}{dt} \quad (3.4)$$

Esta última ecuación no siempre es válida. La relación entre el crecimiento celular y la formación de productos depende del rol del producto dentro del metabolismo celular. Los patrones mas comunes de crecimiento describen la síntesis de productos durante el crecimiento celular y después que éste ha cesado, un tercer patrón, corresponde a aquel donde inicialmente solo se produce crecimiento celular sin formación de producto, pero después de cierto periodo empieza a aparecer el producto mientras el crecimiento continúa. Un ejemplo de esto último se produce en la fermentación de ácido láctico, estudiada por Luedeking y Piret (1959). Ellos encontraron que la velocidad de formación de producto queda descrita por

$$q_p = \alpha\mu + \beta \quad (3.5)$$

La productividad volumétrica (P) es un indicador del desempeño global del proceso. En un cultivo batch es necesario calcular dicho parámetro sobre todo el tiempo utilizado en el proceso, el cual no solo incluye el tiempo de fermentación, sino todo el que se necesita para preparar un nuevo ensayo, es decir incluye: preparación de un nuevo inóculo, lavado del reactor, preparación de medio de alimentación, esterilización y puesta en marcha, de este modo, la productividad volumétrica queda dada por la ecuación 3.6 (Wang, 1978)

$$P = \frac{X_f}{\frac{1}{\mu_m} \ln \frac{X_f}{X_0} + t_T + t_L + t_D} \quad (3.6)$$

X_0 y X_f corresponden a las concentraciones celulares inicial y final, μ_m es la velocidad de crecimiento específica máxima, mientras que t_T , t_D y t_L corresponden a los tiempos de preparación del reactor, esterilización y duración de la nueva fase lag respectivamente.

Por su parte, en el cultivo continuo, la productividad volumétrica se define como

$$P = X \cdot D \quad (3.7)$$

Donde D , corresponde al factor de dilución o en términos más ingenieriles al inverso del tiempo de residencia.

$$D = \frac{F}{V} = \frac{1}{\tau} \quad (3.8)$$

Donde F es la velocidad de flujo de alimentación, V el volumen del reactor y τ el tiempo de residencia. Del balance de materia en un reactor continuo, considerando que la concentración de microorganismos depende sólo del sustrato limitante se tiene que

$$D = \mu \quad (3.9)$$

Donde μ es la velocidad de crecimiento específica.

En el caso del cultivo fed batch, la productividad se mide en función de la cantidad de biomasa o producto formado con respecto a la cantidad de tiempo transcurrido

$$P = \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad (3.10)$$

3.3 Microfiltración

La microfiltración es la tecnología de membranas más antigua de la cual se tiene conocimiento, en general las membranas usadas tienen una estructura microporosa capaz de separar partículas finas con un rango de tamaño entre 0.02 – 20 μm . En la microfiltración por flujo cruzado (CFM) el fluido a ser filtrado fluye en forma paralela a la superficie de la membrana y el permeado pasa a través de la misma debido a una diferencia de presión, el flujo cruzado es capaz de reducir la formación del queque y por tanto lo mantiene a un nivel bajo por lo cual se hace posible operar el equipo en un estado casi – estacionario por largo tiempo (Ripperger y Altmann, 2002).

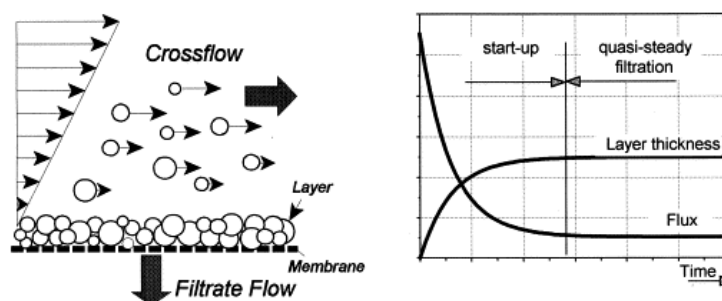


Figura 3.1. Principio de la filtración por flujo cruzado (Tomado de Ripperger y Altmann, 2002)

La estructura microporosa de la membrana de microfiltración permite separar las partículas de acuerdo al tamaño de los poros, por tanto, la separación estará mayormente limitada a la superficie externa de la membrana. El proceso en si, estará principalmente determinado por la formación del queque sobre la superficie, por tanto el conocimiento de cómo funciona la deposición de partículas en el mismo podría resultar en una ventaja económica a la hora de la operación con este tipo de equipos, la figura 3.2 muestra el efecto de esta variable en la operación (Ripperger y Altmann, 2002).

La filtración de flujo cruzado se ve influenciada por diversas variables: velocidad de flujo cruzado (Choi *et al.* 2005), presión transmembrana (Milcent y Carrère, 2001; Giorno *et al.* 2002), resistencia de la membrana, pH (Persson *et al.* 2000; Chan y Chen, 2001), resistencia del queque, distribución de tamaño de las partículas suspendidas, forma de las partículas (Foley *et al.* 2005), capacidad de aglomeración en las partículas (Tanaka *et al.* 1994; 1996) y otros efectos de superficie (Razatos *et al.* 1998; Foley, 2006). En base a esto se han descrito una amplia variedad de modelos de forma de describir el proceso de CFM (Zydney y Colton, 1985; Aimar *et al.* 1989; Lojkin *et al.* 1992), sin embargo, de acuerdo a Ripperger (2002) sólo unos pocos son suficientes para describir el proceso real.

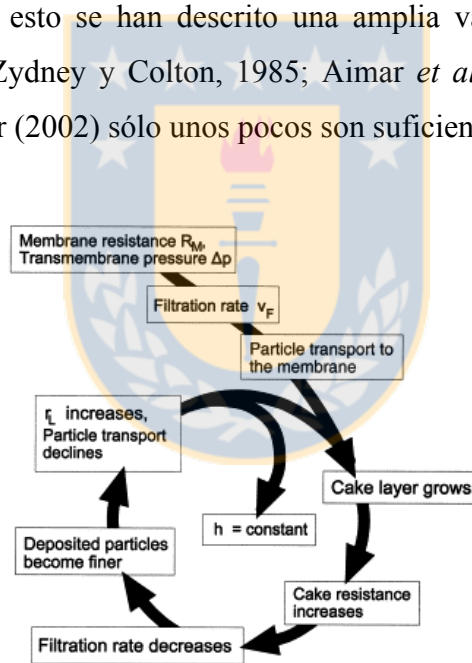


Figura 3.2. Dinámica del crecimiento del depósito de sólidos y su efecto en el flux (v_F). Resistencia del queque: r_L , Resistencia de la membrana R_M , Espesor del queque: h .

En relación al uso de la microfiltración en bacterias ácido lácticas existe amplia información del tema, principalmente asociado a la recuperación de ácido láctico (Carrère *et al.* 2001; Fitriani y Takao, 2010), o a cultivos de alta concentración celular donde se opera en forma continua (Xavier *et al.* 1994; Schiraldi *et al.* 2002; Giorno *et al.* 2002). También existen trabajos donde se ha trabajado en modo

discontinuo, sin embargo, en ellos se ha enfocado el estudio netamente en la influencia de las variables de operación en la densidad de flujo (e.g. Person *et al.* 2000; Carrère *et al.* 2001; 2002) sin proveer información sobre que ocurre con los microorganismos en términos de su viabilidad (a excepción del trabajo de Boyaval *et al.* 1995) y resistencia frente a operaciones de estabilización posteriores. En este sentido este trabajo es un aporte tanto en el conocimiento de la operación de microfiltración aplicada a una cepa autóctona probiótica como también en el hecho de saber si la misma es factible de ser estabilizada mediante una operación posterior, que ya de por si es estresante: secado por atomización.

3.4 Estabilización de biomasa

3.4.1 Secado por atomización

3.4.1.1 Operación del secador

El secado por atomización se define como la transformación de una alimentación en estado fluido a una forma seca por atomización en un medio caliente, en otras palabras, se basa en la evaporación rápida del disolvente por pulverización del producto a secar en el seno de una corriente de gas caliente.

La Fig. 3.3 presenta una instalación típica de secado por atomización, aquí el aire caliente ingresa por la parte superior de la cámara de secado, en esta misma zona se procede a pulverizar la suspensión del producto a secar. En la parte cónica inferior se recoge la mayor parte del producto seco mientras que el aire de secado se escapa por la salida lateral, la porción de finos que éste arrastra es separada y recuperada en los ciclones (Casp y Abril, 1999)

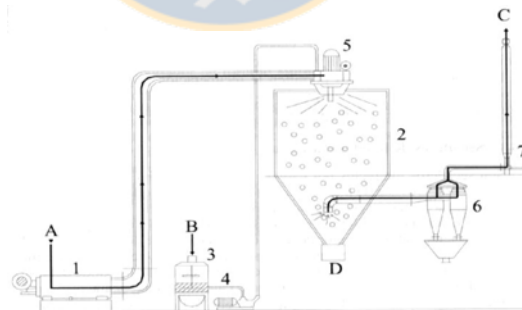


Figura 3.3. Esquema de una instalación de Secado por atomización. 1. Calentador de aire, 2. Torre de desecación, 3. Depósito de alimentación, 4. Bomba de dosificación, 5. Turbina de aspersión, 6. Ciclones separadores, 7. Ventilador principal. (A) Entrada de aire ambiente, (B) Entrada del producto en suspensión, (C) Salida aire usado, (D) Producto seco.

Las ventajas del secado por atomización radican en que los costos energéticos por kg de agua removida son hasta seis veces más bajos que durante la liofilización (Teixeira *et al.* 1995b; Johnson y Etzel, 1995; Gardiner *et al.* 1999; Silva *et al.* 2002), es un proceso rápido y además, al obtenerse un producto seco existen más facilidades tanto de transporte como de distribución (Teixeira *et al.* 1995a; Gardiner *et al.* 1999).

Las desventajas están relacionadas con altas tasas de mortalidad durante la operación (Teixeira *et al.* 1996), baja estabilidad durante el almacenamiento a altas temperaturas (Teixeira *et al.* 1995b; Mauriello *et al.* 1999) y dificultades en la rehidratación del producto (Teixeira *et al.*, 1995b; Mauriello *et al.*, 1999). Sin embargo, diversos estudios señalan que dichas desventajas pueden ser subsanadas mediante adición de diversos agentes prebióticos (Espina y Packard, 1979; Desmond *et al.* 2002; Corcoran *et al.* 2004) o bien realizando modificaciones en la configuración del flujo de aire (co o contracorriente), la temperatura de salida del secador, la cepa o en las labores de pre-adaptación a la cual ha sido sometido el cultivo previo a la operación de secado (Kim y Bhowmik, 1990; Gardiner *et al.* 1999; Corcorán *et al.* 2006).

3.4.1.2 Variables de operación de interés en el secado por atomización

Fase de Crecimiento del microorganismo: Se ha encontrado que células estado estacionario (durante cultivo discontinuo) son mucho más resistentes a operaciones de secado que aquellas en fase lag o exponencial, incluso cuando estas últimas han sido estresadas de manera de mejorar su resistencia. Esto se debería a que durante la fase estacionaria se produce la sobre-expresión de proteínas relacionadas con mecanismos de resistencia térmica (Teixeira *et al.* 1994). Ejemplo de esto último fueron los resultados encontrados por Corcoran *et al.* (2004) con una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* donde células en estado estacionario mostraron, al término de la etapa de secado, un 50% de sobrevivencia versus un 14% de supervivencia de células que se encontraban en fase exponencial al momento de su cosecha.

Termotolerancia: Esta propiedad está relacionada directamente con el microorganismo y se representa a partir de la energía de activación (Espina y Packard, 1979), el tiempo de reducción decimal (D_T) o el valor Z (Teixeira *et al.* 1995a). Estos parámetros dan una idea sobre la resistencia que tendrá la bacteria frente al tratamiento de secado. En el trabajo de Espina y Packard (1979) con *Lactobacillus acidophilus* se encontró un quiebre en la curva de $\ln k$ vs $1/T$ a la altura de 80°C, los autores concluyen que por sobre esta temperatura se necesita mucha menos energía para destruir a la bacteria ($E_a=6.5$ Kcal/mol) que por debajo de la misma ($E_a=23.3$ Kcal/mol), de ahí que la temperatura a la salida del secador

debería ser siempre menor a 80°C. Este quiebre también ha sido reportado para otros microorganismos, tal como lo señalan Labuza *et al.* (1972) en su trabajo con levaduras y Teixeira *et al.* (1994) en sus experiencias posteriores con *Lactobacillus bulgaricus*, donde se encontró una energía de activación igual a 7.99 Kcal/mol cuando la temperatura es superior a los 70°C y e igual a 20.48 Kcal/mol, por debajo de ésta.

Temperatura de salida del secador: Esta es la variable de mayor importancia dentro del proceso de secado spray y determina en gran medida la supervivencia de las bacterias. En general, la mayoría de los trabajos han concluido que la viabilidad de las células disminuye en la medida que aumenta la temperatura de salida del secador (Kim y Bhowmik, 1990; Teixeira *et al.* 1995b; Gardiner *et al.* 2000), sin embargo, no puede trabajarse con temperaturas demasiado bajas porque en ese caso no se cumplirá con el porcentaje de humedad que asegure un producto estable en el tiempo (<10% e idealmente <5%). Uno de los primeros estudios realizados fue el de Espina (Espina y Packard, 1979) quién trabajó con *Lactobacillus acidophilus* encontrando que la mayor viabilidad se obtenía a una temperatura de salida de 75°C ($9.8 \cdot 10^7$ UFC/g), por su parte, Kim encontró que para una cepa de *Lactobacillus bulgaricus*, la temperatura adecuada correspondía sólo a 60°C obteniendo con ello $3.1 \cdot 10^9$ UFC/g (Kim y Bhowmik, 1990), dicho resultado coincide con el de Teixeira, quien determinó que la temperatura de operación óptima debía estar por debajo de los 70°C, de manera de evitar caer en la zona donde es más fácil que se produzca la muerte celular (Teixeira *et al.* 1995a). Trabajando con *Lactobacillus helveticus*, Johnson encontró que la temperatura óptima de secado correspondía a 82°C con un porcentaje de supervivencia de 15% equivalente a $2.1 \cdot 10^{10}$ UFC/g (Johnson y Etzel, 1995), To (To y Etzel, 1997) señala por su parte que para una cepa de *Lactobacillus casei* el mayor porcentaje de recuperación (14.7%) se encontraría trabajando en el rango 65 - 70°C.

Para demostrar las diferencias existentes de una bacteria a otra, Gardiner (Gardiner *et al.* 2000) estudió cepas de *Lactobacillus paracasei* y de *Lactobacillus salivarius* encontrando que a una temperatura de 70°C, para la primera cepa se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia de 97%, mientras que para la segunda éste sólo llegó al 11%. Todo esto tiene como finalidad mostrar que, si bien existe un rango de temperaturas donde se hace factible trabajar (la mayoría alrededor de los 70°C), el valor óptimo dependerá de cada cepa y por tanto es una variable que debe estudiarse antes de realizar la operación.

pH: To señala que previo al secado spray es recomendable llevar la suspensión a un pH cercano a la neutralidad (pH entre 6.5 y 7.0) de manera de asegurar un mayor porcentaje de recuperación celular después de la operación (To y Etzel, 1997).

Rehidratación: Este aspecto es poco mencionado en gran parte de los trabajos, sin embargo, es de importancia crítica para asegurar la viabilidad de las células al momento de su utilización. La única referencia que se tiene es el trabajo de Teixeira donde se encontró que los mejores resultados se obtuvieron cuando las muestras fueron rehidratadas lentamente (en un periodo no superior a los 30 min.) y a una temperatura de 20°C, se señaló además que no existieron diferencias entre los distintos medios de rehidratación (Leche descremada, MRS, agua des-ionizada o Solución Buffer) lo cual podría deberse a que tiene más efecto la solución en la cual se suspenden las células en forma previa al secado spray que la naturaleza de la solución de rehidratación (Teixeira *et al.* 1995b).

3.4.2 Microencapsulación

3.4.2.1 Aspectos generales

Desai y Park (2005) definen la microencapsulación como la tecnología de empaquetar sustancias en fases sólida, líquida o gaseosa en pequeñas cápsulas selladas que pueden liberar su contenido a una velocidad controlada bajo condiciones específicas. De acuerdo a lo que señalan estos mismos autores la composición del material encapsulante es el que determinará finalmente las propiedades funcionales de la microcápsulas. En este sentido, el material encapsulante ideal debería cumplir con las siguientes características

- i. Buenas propiedades reológicas a altas concentraciones.
- ii. Capacidad de dispersarse o emulsificar la sustancia activa y estabilizar la emulsión producida.
- iii. No debe reaccionar con la sustancia a ser encapsulada durante el proceso o durante el almacenamiento.
- iv. Capacidad para mantener la sustancia activa bien protegida y evitar fugas de la misma al ambiente.
- v. Debe ser soluble en solventes usados en la industria de alimentos (e.g. agua)
- vi. Económico
- vii. De grado alimenticio

Difícilmente un solo material pueda cumplir con todas estas características, de ahí que en general se ocupen combinaciones de sustancias a fin de cumplir con la mayor cantidad de los requerimientos listados.

Existen muchas formas en las cuales la microencapsulación puede llevarse a cabo, dentro de estas se pueden nombrar: secado por atomización, congelamiento por atomización, microencapsulación en lecho fluidizado, extrusión, liofilización, coacervación, cocrystalización, entre otras (Gibbs *et al.* 1999). Dentro de todas las técnicas anteriormente citadas el secado por atomización resulta ser una de las más atractivas, esto porque ofrece la ventaja de producir microcápsulas de forma relativamente simple y continua. Otra cosa a tener en cuenta es que, aunque la distribución de tamaño de las cápsulas es función de muchos parámetros, durante la microencapsulación mediante secado por atomización las microcápsulas alcanzan en promedio menos de 100 μm (Ré, 1998).

En cuanto al uso de la microencapsulación de bacterias del género *Lactobacillus*, existe amplia información que avala su uso con resultados que van desde un 70% de supervivencia y mas (ver por ejemplo: Picot y Lacroix, 2004; Ross *et al.* 2005; Pimentel *et al.* 2009; Vidhyalakshmi *et al.* 2009; Wang y Langrish, 2010; Ying *et al.* 2010; Burgain *et al.* 2011)

3.4.2.2 Materiales de encapsulación

De acuerdo a Meng (2008) existe una amplia variedad de materiales encapsulantes, el que se utilice depende principalmente del microorganismo con el cual se está trabajando (Morgan *et al.* 2006), sin embargo, existe una variedad que pareciera funcionar bien con muchas especies, dentro de estos se encuentran la leche descremada, proteína de suero, trehalosa, glicerol, betaína, adonitol, sacarosa, glucosa, lactosa y algunos polímeros como dextrano y polietilenglicol. A continuación se presenta un breve resumen de las características principales de cada una de las sustancias usadas en el desarrollo de esta tesis (Gibbs *et al.* 1999; Mosilhey, 2003; Burgain *et al.* 2011).

Sólidos lácteos

Corresponden a este grupo el lactosuero, la proteína de lactosuero (o concentrado proteico) y la leche descremada. Las características de cada una como material de protección quedan determinadas principalmente por la concentración de proteínas y azúcares presentes. En este sentido, la leche descremada ha sido ampliamente utilizada en estudios de liofilización (Corcoran *et al.* 2004; Carvalho *et al.* 2004; Golowczyc *et al.* 2010), mientras que el uso de lactosuero y de proteína de lactosuero están más asociados a operaciones de secado a alta temperatura (Picot y Lacroix, 2004; Pimentel *et al.* 2009). En todos los casos la presencia de lactosa, un disacárido, es capaz de brindar protección debido a su alta temperatura de transición vítrea (T_g) en comparación a otras sustancias. Junto con todo esto, este

tipo de sustancias tiene asociadas diversas propiedades funcionales que les hacen atractivos especialmente para su uso en productos con fines alimenticios.

Maltodextrina

Corresponde al grupo de almidones modificados y se usan generalmente por su alta solubilidad en agua, su baja viscosidad y porque son fáciles de manipular. Sin embargo, no tiene propiedades emulsificantes, lo cual resulta en una baja retención del material activo durante el secado por atomización. De aquí que sea necesario mezclar con otras sustancias a fin de obtener el resultado deseado.

Goma arábiga

Conocida también como goma acacia es un hidrocoloide producido por la exudación natural de árboles acacia y está conformada principalmente por ácido D-glucurónico, L-ramnosa, D-galactosa y L – arabinosa. Es un efectivo agente encapsulante debido a su alta solubilidad en agua, su baja viscosidad en relación a otras gomas a la misma concentración y su capacidad de actuar como agente emulsificante actuando como interfase entre agua y aceite.

Pectina

Es uno de los componentes más importantes de la pared celular jugando un papel muy importante en el crecimiento celular y en la defensa contra el ataque de otros microorganismos. Las pectinas están compuestas de ácido galacturónico con residuos de L-ramnosa. Uno de los principales atributos de estas sustancias radica en su capacidad de gelificación bajo las condiciones adecuadas. Junto con esto, las pectinas juegan un papel importante en la nutrición y la salud, dado que al ser una fibra dietética, son factibles de ser fermentadas por la microflora benéfica existente en el colon.

Azúcares (Fructosa y Sacarosa)

Al igual que lo mencionado en el caso de la lactosa, la temperatura de transición vítrea en estas especies además de la capacidad reconocida que tienen de reemplazar las moléculas de agua que se pierden durante la deshidratación, evitando con ello variaciones a nivel de la membrana celular, las hace especialmente atractivas como materiales de protección (Crowe *et al.* 1987; Linders *et al.* 1997; Silva *et al.* 2004). Sin embargo, deben mezclarse con otras sustancias a fin de mejorar su comportamiento a altas temperaturas, donde dependiendo de su concentración pueden caramelizar y/o

provocar problemas en la atomización o en el descuelgue del producto en el caso del secado por atomización.

Glutamato monosódico

Es uno de los aminoácidos no esenciales más abundantes en la naturaleza, ha sido reconocido como GRAS en Estados Unidos y es un reconocido aditivo alimenticio. Sin embargo, el glutamato ha sido también ampliamente utilizado como agente de protección durante la liofilización (Martos *et al.* 2007) dado que se le atribuye la capacidad de estabilizar las estructuras de las proteínas mediante la reacción entre los grupos amino del glutamato y los grupos carboxilo presentes en las proteínas de los microorganismos (Carvalho *et al.* 2003) y, además de esto, se ha reportado que tiene la capacidad de retener una gran cantidad de humedad residual (Font de Valdez *et al.* 1985).

Su uso como material de encapsulación en el proceso de secado por atomización no es tan común como las sustancias anteriormente descritas. Sin embargo, se han publicado buenos resultados al usarlo como aditivo en el medio de cultivo (Ferreira *et al.* 2005) o como material encapsulante en conjunto con trehalosa (Sunny-Roberts y Knorr, 2009) o leche descremada (Golowczyc *et al.* 2010). En todos los casos, la concentración recomendada es de 12.5 g/L.

Sorbitol

Es un polialcohol de la glucosa y ha sido usado con buenos resultados en la liofilización (Font de Valdez *et al.* 1983; Leslie *et al.* 1995; Linders *et al.* 1997) y en el secado a vacío (Santivarangkna *et al.* 2006) de bacterias lácticas. Los mecanismos por los cuales se ha buscado establecer su labor protectora incluyen la prevención del daño en la membrana producto de su interacción con la misma y por otro lado la estabilización de proteínas en su funcionalidad y estructura (Carvalho *et al.* 2002).

3.4.3 Estrés como forma de aumentar la resistencia durante el secado

3.4.3.1 Estrés térmico

El estrés térmico consiste en exponer a las células a una temperatura moderadamente elevada, en comparación a la que es óptima a su crecimiento.

Con un tratamiento de estrés térmico, se ha encontrado que los microorganismos adquieren una resistencia elevada a cambios más severos de temperatura, todo lo cual resulta de gran utilidad para los procesos de estabilización (Teixeira *et al.* 1994; Kim *et al.* 2001; Saarela *et al.* 2004). Sin perjuicio de esto último, la respuesta de las células al estrés térmico es dependiente de la edad de las células, del medio de fermentación y de la historia de cultivo así como del medio en el que se realiza el shock

térmico (Teixeira *et al.* 1994). La razón por la cual se quiere hacer a las células más resistentes a las altas temperaturas radica en el hecho de que bajo estas condiciones, y en ausencia de tratamiento, se produciría la desnaturalización de las proteínas, una consecuente agregación de las mismas y finalmente la desestabilización de macromoléculas y ribosomas además de lo cual se producirán alteraciones en la fluidez de la membrana (Guchte *et al.* 2002).

Las respuestas al estrés térmico (así como en el estrés osmótico y ácido) están caracterizadas por la inducción en la producción de proteínas generales y específicas y por una serie de cambios fisiológicos en la membrana que aumentan las capacidades del microorganismo para soportar condiciones adversas de su ambiente (Whitaker y Batt, 1991; Teixeira *et al.* 1994; Prasad *et al.* 2003).

En relación a cambios en las proteínas, en bacterias estresadas térmicamente se produjo la sobre expresión de 13 proteínas, de las cuales dos resultaron ser homólogas de GroEL y DnaK (de acuerdo a los pesos moleculares 67 y 76 kDa), con lo cual se demostró que *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus rhamnosus* despliegan una respuesta al estrés térmico similar a la observada en otras bacterias mesofílicas (Whitaker y Batt, 1991; Prasad *et al.* 2003; Desmond *et al.* 2004).

3.4.3.2 Estrés salino

El estrés salino se produce al alterar la concentración de uno o más metabolitos en el medio en el cual se encuentran las células, debido a esto y que la membrana citoplasmática de las bacterias es permeable al agua pero no a metabolitos, el estrés hiper o hipo-osmótico causará la salida o entrada de agua, lo cual se verá representado por una disminución o aumento del volumen citoplasmático, respectivamente (Csonka, 1989).

La respuesta de un microorganismo a los cambios externos de osmolaridad pueden ser divididos en tres partes: un rápido aumento o disminución de volumen citoplasmático seguido por una serie de ajustes bioquímicos que permiten a la célula recuperar un volumen compatible con su crecimiento, y finalmente la reanudación del crecimiento bajo las nuevas condiciones (Csonka, 1989). La única excepción a este mecanismo se presentó al estresar las células con altas concentraciones de azúcares ya que la presencia de azúcares internos de la célula lograron establecer un nuevo equilibrio después de un corto tiempo por lo cual sólo se logró un estrés osmótico transiente (Glaasker *et al.* 1998).

En las bacterias ácido lácticas las respuestas adaptativas son el modo usual de protección frente al estrés (Kim *et al.* 2001; Guchte *et al.* 2002; Desmond *et al.* 2004). Se cree que la señal de estrés osmótico es transmitida a través de transportadores, los cuales interactúan con la membrana lipídica, y una vez ocurrido esto comienzan a manifestarse una serie de cambios al interior de la célula, los cuales tienen que ver con la producción de solutos compatibles, cambios en la composición de los ácidos grasos de la membrana, cambios en producción de exopolisacáridos, alteraciones en la producción de bacteriocinas (Guchte *et al.* 2002) y sobre-expresión de algunas proteínas específicas (Kim *et al.* 2001; Guchte *et al.* 2002; Prasad *et al.* 2003).

Los solutos compatibles se definen como aquellos solutos que no tienen carga eléctrica neta a pH=7, no son capaces de atravesar la membrana celular y pueden ser acumulados sin causar grandes disturbios ni inhibición en las estructuras macromoleculares celulares, razón por la cual juegan un papel importante en el equilibrio de la actividad de agua en uno y otro lado de la célula ante estrés osmótico (Csonka, 1989; Kets *et al.* 1996; Prasad *et al.* 2003). Con respecto a la sobre-expresión de proteínas se encontró que existe un grupo de proteínas que son inducidas tanto por situaciones de estrés salino como por estrés térmico, estas son aquellas conocidas como: GroES, GroEL y DnaK (Kim *et al.* 2001; Guchte *et al.* 2002). Los cambios en la membrana se deben a que la estructura lipídica de la misma actúa como osmómetro (Guerzoni *et al.* 2001; Tymczyszyn *et al.* 2005), la mayoría de los trabajos recalcan el aumento en la proporción de ácidos insaturados, haciendo hincapié en que el grado de instauración tiene un efecto importantísimo en la permeabilidad de la membrana (Teixeira *et al.* 1996; Guerzoni *et al.* 2001). Se ha dicho también que el aumento de ácidos grasos insaturados en la membrana previene el daño por oxidación, principalmente porque la reacción de insaturación de los mismos es oxígeno-dependiente (Guerzoni *et al.* 2001).

En relación a efectos cruzados se ha encontrado que cepas de *Lactobacillus acidophilus* han resultado ser significativamente más resistentes al estrés térmico y a la presencia de bilis cuando han sido expuestas a estrés osmótico dada por una solución de NaCl (Kim *et al.* 2001). Además de esto, se ha encontrado que una cepa de *Lactobacillus paracasei* que había sido estresada osmóticamente, mostró una viabilidad 16 veces mayor en comparación a la misma cepa sin estresar durante el proceso de secado spray (Roos *et al.* 2005).

3.4.3.3 Estrés ácido

El estrés ácido se genera al poner a la bacteria en contacto con una solución ácida (bilis, ácido láctico u otros ácidos orgánicos), generalmente con $\text{pH} < 5.0$ (Roos *et al.*, 2005), durante un tiempo entre 15 a 60 minutos (Lorca *et al.* 1998).

En general, las cepas sometidas a estrés ácido son aquellas que no cuentan con características acidogénicas (capacidad de producir ácido a bajos pH) o acidúricas (capacidad de funcionar a bajos pH) (Guchte *et al.* 2002) y/o que deberán actuar como agentes probióticos al interior de otros organismos donde deben resistir las adversas condiciones de la zona gastrointestinal (Lorca *et al.* 1998; Lorca y Font de Valdez, 2001; Roos *et al.* 2005).

Cuando las bacterias no se encuentran adaptadas los ácidos difunden pasivamente a través de la membrana celular e ingresan al citoplasma, donde rápidamente se disocian en protones y moléculas cargadas negativamente. Esta acidificación intensa reduce la actividad de algunas enzimas y daña proteínas y ADN. La adaptación de las cepas a un ambiente ácido incluye un enriquecimiento en las cadenas de ácidos grasos insaturados lo cual causaría una reducción en la permeabilidad de la membrana a la difusión de los ácidos hacia el interior de las células (Guchte *et al.* 2002)

Dentro de los efectos directos se ha encontrado que cepas pre-adaptadas durante 15 minutos a $\text{pH}=4.2$ o durante 60 minutos a $\text{pH}=5.0$, fueron capaces de resistir un $\text{pH}=3.0$ durante 60 minutos, registrando un porcentaje de sobrevivencia de 10 y 1% respectivamente. Se cree, además, que ambas adaptaciones se deben a distintas causas, en el primer caso ($\text{pH}=4.2$) habría existido un incremento en la actividad enzimática, mientras que en el segundo ($\text{pH}=5.0$) habría existido un cambio en la composición celular (Lorca *et al.* 1998). Se ha reportado también que en cultivos sin control de pH se ha producido la sobre-expresión de 9 proteínas (entre 14 y 56 kDa) que son exclusivamente inducidas por el aumento de acidez en el medio (Lorca y Font de Valdez, 2001; Guchte *et al.* 2002).

Con respecto a los efectos cruzados, trabajando con una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, Kim encontró que las células que fueron pre-expuestas a estrés ácido fueron significativamente más resistentes a niveles letales de temperatura, no así a niveles altos de NaCl (Kim *et al.* 2001; Lorca y Font de Valdez, 2001; Guchte *et al.* 2002). Para esta misma cepa, Lorca reportó que el estrés ácido fue capaz de brindar protección frente a H_2O_2 , etanol, congelamiento y liofilización (Lorca y Font de Valdez, 2001). En casos en que el pH no fue controlado durante la fermentación el estrés ácido ayudó a la resistencia térmica posterior durante el secado por atomización (Teixeira *et al.* 1994).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Microorganismos

La cepa probiótica empleada fue aislada de agallas de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) proveniente de las zonas lago Llanquihue y Villarrica, posteriormente fue identificada mediante pruebas API como *Lactobacillus plantarum* (LPS47). La cepa pura se mantiene congelada en medio leche-extracto de levadura (LEL) a -20°C en el laboratorio de Bioprocesos de la Universidad de Concepción.

Para las pruebas de estabilidad post secado se hizo un ensayo de inhibición de una cepa patógena, el microorganismo utilizado fue *Yersinia ruckeri* (B19), cepa que fue aislada durante brotes de Yersiniosis en pisciculturas del sur de Chile durante el año 2005. La cepa se encuentra liofilizada y se conserva en el laboratorio de Ictiopatología de la Universidad de Concepción.

4.1.2 Medios de activación y cultivo

4.1.2.1 Caldo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS)

Se empleó para realizar las activaciones, traspasos y conteos de la cepa *Lactobacillus plantarum*. Se utilizó además para la medición del daño en la membrana celular post-secado. En la tabla siguiente se informa su composición

Tabla 4.1. Composición del MRS

	<i>Concentración(g/L)</i>
Peptona caseína	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
D(+)-glucosa	20
Dipotasio hidrogenofosfato	2
Acetato de sodio	5
Diamonio hidrogenocitrato	2
Sulfato de magnesio	0,2
Sulfato de manganeso	0,04
Tween 80	1
Agar-agar	15 (Conteo en placas)
NaCl	40 (Daño en membrana)

4.1.2.2 Medio tradicional (MT)

Permeado de lactosuero enriquecido con peptona, extracto de levadura y minerales. No es posible informar su composición debido a encontrarse en trámite de patente.

4.1.2.3 Caldo CASO (tripticasa)

Se empleó para realizar las activaciones, trasposos y conteos de la cepa B19. En la tabla siguiente se informa su composición

Tabla 4.2. Composición caldo CASO

	<i>Concentración(g/L)</i>
Peptona de caseína	17,0
Peptona de harina de soja	3,0
D(+)-glucosa	2,5
Cloruro de sodio	5,0
Hidrogenofosfato dipotásico	2,5
Agar-agar	15,0 (Conteo en placas)
Cristal violeta	1 mL (Conteo en placas)

4.1.2.4 LAPTg

Medio empleado para el cultivo en la cinética de inhibición de la cepa *Y. ruckeri* por acción de la cepa *L. plantarum*.

Tabla 4.3. Composición LAPTg

	<i>Concentración(g/L)</i>
Peptona caseína	10,0
Peptona carne	15,0
Extracto de levadura	10,0
D(+)-glucosa	10,0
Tween 80	1,0 mL

4.1.3 Otros reactivos y sustancias

Tabla 4.4. Lista de reactivos y sustancias misceláneas usadas en los experimentos

Sustancia	Proveedor	Sustancia	Proveedor
Acetato de sodio	Merck	Lactosuero	Lactín
Agar	Merck	Leche descremada	Svelty Digestion
Alcohol-acetona	Arquimed	Lugol	Arquimed
Caldo CASO tripticasa	Merck	Maltodextrina	Globe
Caldo MRS	Merck	Pectina	Droguería Alemana
Cloruro de sodio	Merck	Peptona de carne	Merck
Cristal violeta	Arquimed	Peptona de caseína	Merck
D-glucosa	Merck	Permeado de Lactosuero	Lactín
Diamonio hidrógeno citrato	Merck	Potasio di hidrógeno fosfato	Merck
Dipotasio hidrógeno fosfato	Merck	Proteína de suero	Lactín
Enzima lactasa	Maxilac	Sacarosa	Iansa
Extracto de levadura	Merck	Safranina	Arquimed
Glutamato monosódico	Prinal	Sorbitol	Prinal
Goma arábiga	Droguería Alemana	Sulfato de magnesio	Merck
Hidróxido de sodio	Merck	Sulfato de manganeso	Merck
Hipoclorito de sodio	Clorinda	Tween 80	Merck

4.1.4 Equipos e Instrumentación

	Marca/Modelo/País de origen	Características relevantes
Autoclave	Maestranza local/Concepción, Chile Construido en el marco del proyecto Fondef D01I1121.	Acero inoxidable. Volumen útil 0.3 m ³
Fermentador	Maestranza local/Concepción, Chile Construido en el marco del proyecto Fondef D01I1121.	Acero inoxidable. Volumen total 3 L. Posee la configuración y las entradas necesarias para hacer control de pH y temperatura (chaqueta calefactora).
Fermentador	Maestranza local/Concepción, Chile Construido en el marco del proyecto Innova Chile 05CT6PPT-13	Acero inoxidable. Volumen total 30 L. Posee control de temperatura (chaqueta calefactora), pH y oxígeno disuelto.
Equipo de Filtración	Rhodia Orelis	Módulo SC1 de acero inoxidable con configuración tubular. Acoplado con una bomba de tornillo de acero inoxidable (2,8 GI, Pompe Moineau, Vanves, Francia), un medidor magnético de flujo de la alimentación (H 256/A, Krohne, Romans, Francia), un intercambiador de calor de tubos concéntricos de acero inoxidable y tres manómetros (MEM, Bourdon Seme, Vendome, Francia), que indican presión de alimentación y salida de concentrado y permeado respectivamente.



	Marca/Modelo/País de origen	Características relevantes
Membrana MF	Carbosep®14	Elaborada de óxido de zirconio y dióxido de titanio en soporte de carbón. 0.14 µm, Área=0.0225 m ² , K=9.8
Secador atomización planta piloto	Maestranza local/Chile Construido en el marco del proyecto Innova Chile 05CT6PPT-13	Acero inoxidable. Capacidad evaporativa de 2.8 kg/h agua. Boquilla atomizadora de dos fluidos (diam. interior de 0.8 mm).
Secador atomización industrial	GEA Niro Atomizer/Serie VSD – F /Dinamarca	Capacidad evaporativa 30 kg/h
Estufas de incubación	Thermo Electron Corporation/63505/Alemania Heraeus /B16/ Alemania Heraeus/T6/ Alemania	Con ventilación Alcanza 150°C
Centrífuga	Heraeus/Sepatech Suprafuge 22/Alemania Heraeus/Sepatech Labofuge 2502/Alemania	
Centrífuga de discos	Westfalia Separator/LG 205/Alemania	40 discos. Velocidad fija de rotación: 1500 rpm.
Bombas peristálticas	Cole-Palmer Masterfex/L/S 7524-55/Estados Unidos	
Balanzas	Precisa/ BJ 6100D/Suiza Precisa/XB 220 ^a /Suiza	Sensibilidad de 0.1 g. Máx. 6100 g Sensibilidad de 0.0001 g. Máx. 220 g
Medidor de humedad	Precisa Moisture Analyzer/ HÁ60/ Suiza	Sensibilidad de 0.0001 g. Precisión de 0.01% en la medida de humedad.
Espectrofotómetro	Cole Parmer /1200/Estados Unidos Jenway/6405 UV/Vis./ Reino Unido	
Medidor de pH	Hanna Instruments/HI-2221 Calibration Check pH/ORP Meter/Estados Unidos	

	Marca/Modelo/País de origen	Características relevantes
Vortex	Vortex Mixer/VM 300/Taiwan	
Agitador orbital	Gerhardt/RO 10/ Canadá	
Ultra Turrax	Heidolph/DIAX600/Alemania	
Viscosímetro	Brookfield/LVDVI+/Estados Unidos	
Higrómetro	NOVATRON/Novasina MS1/Londres	Humedad relativa : 5 - 95%; Temperatura : 0 a 50° C Precisión: 1%, 0.2° C
Tensiómetro	KSV/Sigma 700/Finlandia	
Microscopio	ZEISS/Primo Star/ Alemania	
Microscopio TEM bacterias	JEOL/ JEM 1200 EXII / Japón	
Microscopio TEM para fotografías microcápsulas.	JEOL/EO JSM 380/ Japón	
Medidor de distribución de tamaño de partícula	Microtrac/S3500 / Nikkiso CO., LTD., San Diego, Estados Unidos	



4.2 Metodologías

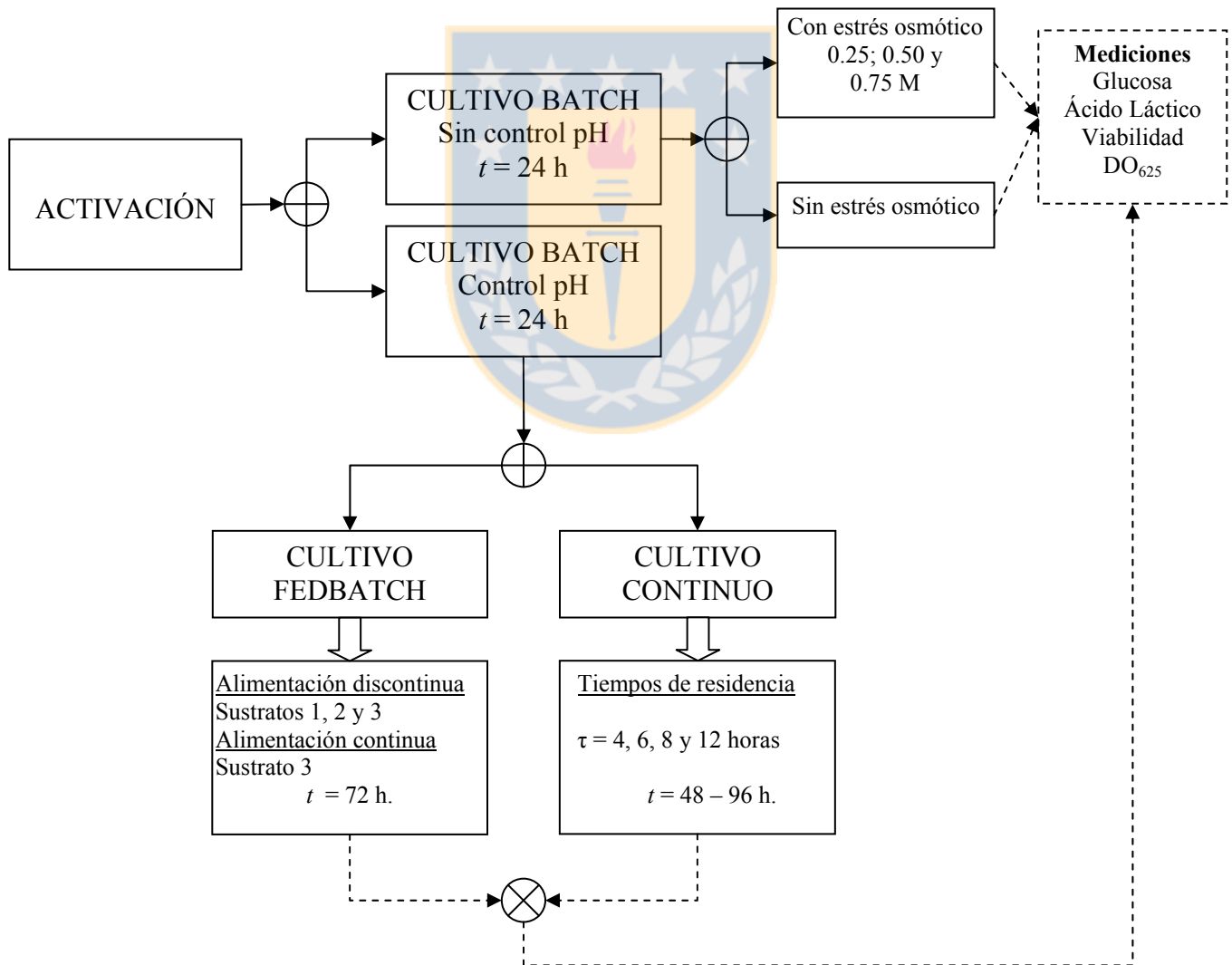
4.2.1 Diagramas de flujo

A continuación se presenta en forma esquemática el trabajo experimental desarrollado a lo largo de esta tesis, los parámetros estudiados y las variables medidas. Posteriormente se ofrece un detalle de cada una de las actividades.

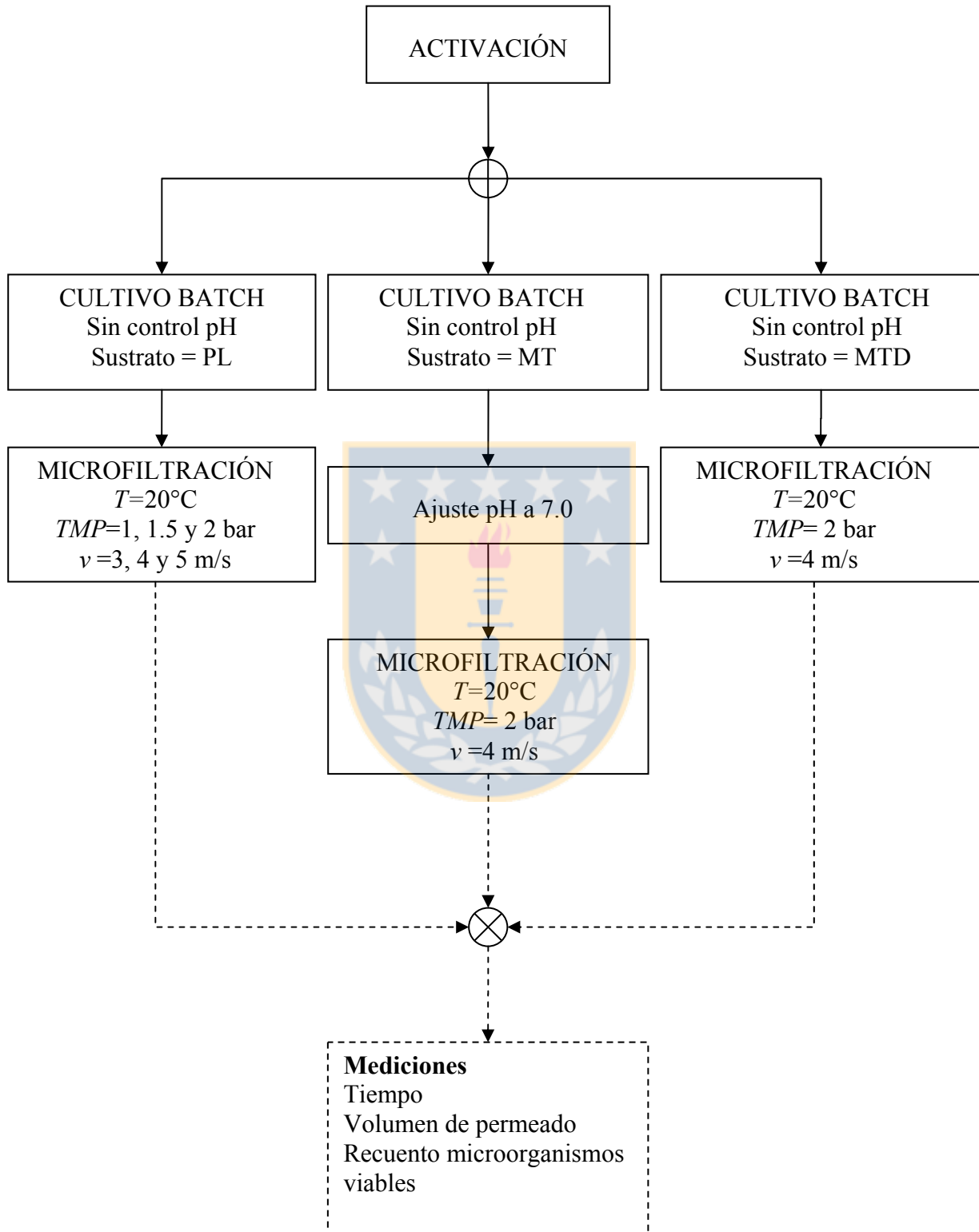
4.2.1.1 Diagrama Global



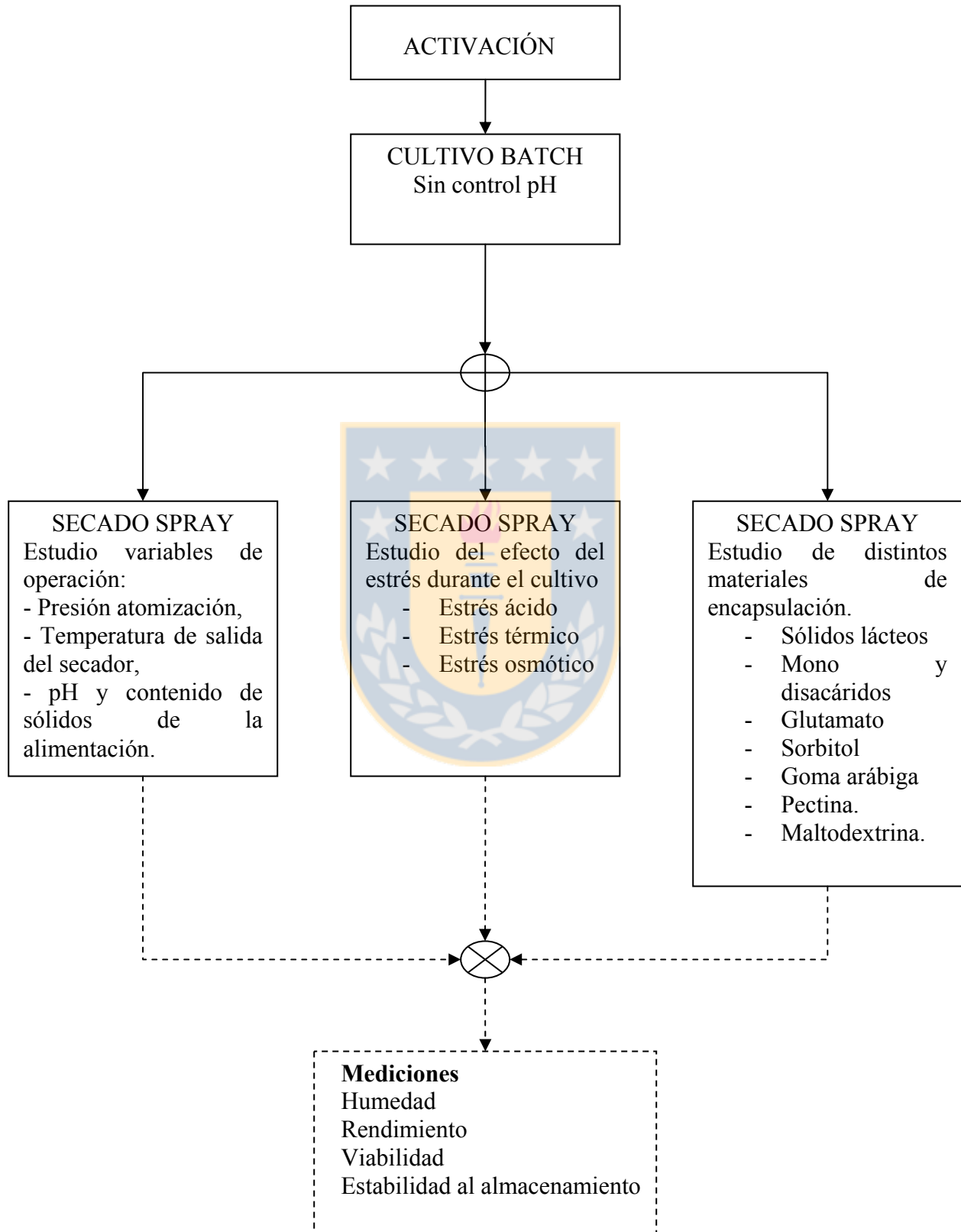
4.2.1.2 Cultivo



4.2.1.3 Concentración de biomasa



4.2.1.4 Estabilización de biomasa



4.2.2 Activación

4.2.2.1 *Lactobacillus plantarum*

Del tubo que conserva *L. plantarum* autóctono congelado a -20°C , se extrajeron 100 μl y se traspasaron a 4 ml de caldo MRS (previamente esterilizado). Este último tubo se dejó a 25°C ó 32°C (según corresponda) por 24 h. Transcurrido este tiempo se tomaron 100 μl de este tubo y se pusieron en un nuevo tubo con 4 ml de MRS fresco para ser incubados a 25°C (ó 32°C) durante las siguientes 12 h. Una vez cumplido este tiempo, se procedió a preparar el inóculo correspondiente.

4.2.2.2 *Yersinia ruckeri*

El método de activación es análogo al de la cepa probiótica *L. plantarum*, con la única salvedad de usar caldo CASO en vez de caldo MRS. La temperatura de incubación fue de 25°C .

4.2.3 Preparación del inóculo

4.2.3.1 *Lactobacillus plantarum*

Transcurridas las últimas 12 horas del protocolo de activación se procedió a centrifugar el tubo (5000 rpm por 10 min). El pellet resultante de la centrifugación se resuspendió en 1 ml de suero fisiológico (NaCl 0.9%). De esta suspensión se tomaron 70 – 120 μl y se traspasaron a un tubo con 4 ml de suero fisiológico de forma de alcanzar una densidad óptica a 625 nm (DO_{625}) entre 0.5 – 0.6 unidades de absorbancia, lo cual asegura un inóculo de $\sim 10^8$ UFC/ml.

4.2.3.2 *Yersinia ruckeri*

Finalizado el segundo traspaso, la cepa fue centrifugada en forma análoga a *L. plantarum*. El pellet resultante se resuspendió en 2 ml de suero fisiológico y se volvió a centrifugar, el pellet de este segundo lavado se resuspendió en 1 ml de suero fisiológico para ser usado en el ajuste de densidad óptica. Para el ensayo de inhibición se ajustó DO_{625} entre 0.1 – 0.2, lo cual fue equivalente a una concentración de $\sim 10^4$ UFC/ml para este microorganismo.

4.2.4 Cultivo

4.2.4.1 Preparación medio de cultivo

La preparación del medio tradicional (MT) constó de dos etapas, en la primera de ellas se procedió a hidrolizar el permeado de lactosuero, para lo cual se utilizó enzima lactasa a razón de 6 ml/ l de medio de cultivo. La solución se mantuvo agitada a 42°C por 90 min. Finalizada esta etapa se procedió a

agregar la peptona, el extracto de levadura y minerales y se ajustó el pH a un valor de 6.0. La esterilización se llevó a cabo a 90°C con un tiempo de retención de 15 minutos.

En los ensayos de microfiltración se utilizó además del medio tradicional, un medio simplificado al cual no se le agregó peptona de caseína (MTD) y otro medio consistente sólo en permeado de lactosuero (PL).

Para los experimentos de secado con estrés osmótico, el medio tradicional fue suplementado con NaCl a fin de alcanzar concentraciones de 0.25; 0.50 y 0.75 M.

4.2.4.2 Cultivo discontinuo

Dependiendo del uso que se dio al cultivo los experimentos en modo discontinuo se llevaron a cabo de diferente forma.

Cultivo en matraces

Para los ensayos de secado el cultivo se llevó a cabo en matraces erlenmeyer de 1 litro con un volumen de trabajo de 500 ml. Se usó un inóculo de 875 µl (0.18% v/v) a fin de alcanzar una concentración inicial de $\sim 10^5$ UFC/ml. Los matraces fueron puestos en un agitador orbital (Nivel 5) dentro de un incubador a 25°C o 32°C según correspondiera. No se controló pH. El cultivo se siguió por 30 h.

Para los ensayos de filtración relacionados con la búsqueda de las mejores condiciones de operación (ver 4.2.4.1 y 4.2.4.2) el cultivo se llevó a cabo en matraces de 4 l con un volumen de trabajo de 2 l. La temperatura de cultivo se fijó en 32°C y no se controló pH. Al finalizar el cultivo, los 2 litros de caldo de fermentación se diluyeron con agua destilada estéril hasta completar un volumen de 8 l.

Cultivo en bioreactores

Se utilizó un reactor de 3 L con un volumen de trabajo de 1.5 L. Los ensayos se llevaron a cabo usando un inóculo de 3.5 ml (0.18% v/v) y como condiciones de temperatura y agitación 32°C y 200 rpm respectivamente. En los casos en que se utilizó control de pH, este se mantuvo en un valor de 5.5 mediante la adición de hidróxido de sodio (NaOH) de concentración 5 M.

Para el ensayo a escala piloto se utilizó el reactor de 30 L con un volumen de trabajo de 20 L. El inóculo fue de 35 ml. La temperatura así como la agitación se mantuvieron constantes en 32°C y 400

rpm respectivamente. No hubo control de pH. Luego de 24 horas se dio por terminada la fermentación y se procedió a filtrar haciendo uso de la membrana de microfiltración.

4.2.4.3 Cultivo fed-batch

Los cultivos fedbatch se llevaron a cabo en el fermentador de 3 L con un volumen de trabajo de 1.5 L. Todos los experimentos fedbatch se iniciaron con un cultivo en modo discontinuo (32°C, agitación de 200 rpm y pH=5.5) hasta las 24 horas, momento en el cual la concentración de glucosa bajó a menos de 0.5 g/l. Se probaron tres sustratos, detallados en tabla 4.5 y dos estrategias de incorporación de sustrato.

Tabla 4.5. Composición de sustratos usados en cultivos en modo fedbatch. Valores en g por 100 ml.

	Glucosa	Permeado de lactosuero	Peptona caseína
Sustrato 1	20	-	-
Sustrato 2	-	50	-
Sustrato 3	-	50	2.5

Estrategia 1. Pulsos de alimentación

Terminadas las 24 horas de cultivo en modo discontinuo se procedió a remover 100 ml de medio de cultivo y se reemplazó por 100 ml de alimentación fresca la cual estuvo compuesta por cualquiera de los tres sustratos detallados en la tabla 4.5. Transcurridas 12 horas se repitió el procedimiento y así sucesivamente hasta completar 72 horas de cultivo. En cada uno de los recambios se tomó una muestra de 30 ml de caldo de fermentación a fin de medir DO₆₂₅, concentración de glucosa y de ácido láctico.

Estrategia 2. Alimentación continua

Finalizado el cultivo en modo discontinuo se procedió a alimentar el sustrato 3 a razón de 0.17 ml/min hasta completar 72 horas de cultivo. Se tomaron muestras del caldo de fermentación cada 12 horas a fin de medir DO₆₂₅, concentración de glucosa y de ácido láctico.

4.2.4.4 Cultivo continuo

Los cultivos en modo continuo se llevaron a cabo en el fermentador de 3 L con un volumen de trabajo de 1.5 L. Todos los experimentos se iniciaron con un periodo en modo discontinuo (32°C, agitación de 200 rpm y pH=5.5) de 24 horas a fin de permitir que las bacterias alcanzaran la fase estacionaria de crecimiento, transcurrido este tiempo, se inició la alimentación del medio de cultivo (detallado en 4.2.3.1) y la descarga de caldo de fermentación a la misma velocidad de flujo a fin de mantener el

volumen del reactor constante. Las velocidades de flujo estuvieron determinadas por los distintos tiempos de residencia, que en este caso fueron de 4, 6, 8 y 12 horas. Los cultivos se siguieron hasta completar seis tiempos de residencia (6τ) y durante este tiempo se tomaron muestras del reactor para medir DO_{625} , concentración de glucosa y de ácido láctico. El pH durante todas las experiencias se mantuvo constante en un valor de 5.5.

4.2.5 Concentración de biomasa

4.2.5.1 Resistencia de la membrana

La resistencia de la membrana se obtuvo haciendo pasar agua destilada a distintas presiones y se midió para cada presión el volumen de permeado recolectado en un determinado periodo, con esto fue posible obtener el flux y con ello construir la gráfica de J versus PTM cuya pendiente correspondió a la resistencia de la membrana limpia, R_M . Por otro lado, una vez terminado el trabajo con el caldo de fermentación se hizo pasar nuevamente agua y se midió el flux en función de la membrana, esto permitió conocer la resistencia de la membrana sucia.

4.2.5.2 Microfiltración

En el módulo Rhodia – Orelis anteriormente descrito, se evaluaron las condiciones de presión transmembrana (PTM), velocidad tangencial (v), pH y medio de cultivo de acuerdo a las condiciones detalladas en la tabla 4.6. La temperatura en todos los casos se mantuvo constante e igual a 20°C.

Tabla 4.6. Condiciones de operación para ensayos de microfiltración.

Ensayo	Medio	v , m/s	PTM, bar	pH
1	PL	4	1	3.5
2	PL	4	1.5	3.5
3	PL	4	2	3.5
4	PL	3	2	3.5
5	PL	5	2	3.5
6	MT	4	2	3.5
7	MT	4	2	7
8	MTD	4	2	3.5

La operación en todos los casos se realizó por 80 ó 120 minutos y durante ese tiempo cada 5 minutos se midió el volumen de permeado obtenido en una probeta y el tiempo transcurrido, a partir de esto más el área de la membrana fue posible calcular la densidad de flujo de permeado. Para cada ensayo se tomaron cinco muestras en forma estéril a lo largo de la filtración a las cuales se les hizo recuento de microorganismos viables. Cada muestra fue almacenada a 4°C y analizada durante el transcurso del día.

4.2.6 Estabilización mediante secado por atomización

4.2.6.1 Operación del secador

El procedimiento completo para la operación adecuada del secador por atomización se encuentra detallado en el apéndice E.

4.2.6.2 Efecto de las condiciones de operación del secador

Lactobacillus plantarum fue cultivado en matraces haciendo uso del medio tradicional de cultivo, a una temperatura de 25°C, bajo agitación constante de 200 rpm y sin control de pH. Una vez que las bacterias alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento, fueron centrifugadas y resuspendidas en suero fisiológico al mismo volumen que tenían en el medio de cultivo. A esta suspensión se agregó lactosuero como material de protección y fue llevada al secador por aspersion con una temperatura de entrada de 180 ± 2 °C. Las restantes condiciones de operación se resumen en la siguiente tabla

Tabla 4.7. Condiciones de secado por atomización de *Lactobacillus plantarum*.

Ensayo	Presión atomización, bar	Temperatura de salida, °C	pH alimentación	Concentración alimentación, %p/p
1	1	70	4.5	20
2	2	70	4.5	20
3	3	70	4.5	20
4	2	80	4.5	20
5	2	90	4.5	20
6	2	70	6.0	20
7	2	70	4.5	30
8	2	70	4.5	40
9	2	70	4.5	50

4.2.6.3 Efecto del estrés durante el cultivo

Estrés térmico

Se cambió la temperatura de cultivo de 25°C a 32°C manteniendo las demás condiciones inalteradas. Al completarse 24 h de cultivo se centrifugó el caldo de fermentación y se procedió a resuspender la biomasa en suero fisiológico para después agregar el lactosuero y preparar el deshidratado de acuerdo a las condiciones óptimas encontradas producto de los ensayos detallados en el punto 4.2.5.2. Tanto al finalizar el cultivo como después del secado se tomaron muestras para hacer recuento de microorganismos viables.

Estrés osmótico

Para estos experimentos se modificó el medio de cultivo de acuerdo a lo que se señaló en 4.3.2.1. Una vez finalizado el cultivo, se centrifugó el caldo de fermentación y la biomasa se resuspendió en 100 ml de suero fisiológico. Aparte, en 400 ml de suero fisiológico se disolvieron los materiales de protección detallados en la tabla 4.8 a una concentración del 20% p/p. Previo al secado, se mezcló la suspensión de biomasa y la solución de protección y se llevaron al secador para ser deshidratadas bajo las condiciones óptimas encontradas en 4.2.5.2.

4.2.6.4 Efecto de la centrifugación

Con miras a reducir las etapas intermedias para obtener el producto probiótico final, se procedió a eliminar la etapa de centrifugación, es decir, una vez que finalizó el cultivo, los materiales de protección se agregaron directamente al caldo de fermentación y se procedió a llevar la suspensión resultante al secador por atomización. Se tomaron muestras antes e inmediatamente después del secado para hacer recuento de microorganismos.

4.2.6.5 Efecto de los materiales de encapsulación

Una vez definidas las mejores condiciones de operación para el secador, entre ellas, la concentración de sólidos (20% p/p), se procedió a evaluar una serie de sustancias y mezclas de ellas a fin de determinar cual brindaba una mejor protección, no sólo durante el secado, sino también durante el almacenamiento a diferentes temperaturas. La forma de incorporación varió en función de si el caldo de fermentación fue o no centrifugado en forma anterior al secado.

Cuando existió centrifugación, la biomasa fue separada del caldo (8000 rpm, 15 min) y resuspendida en 100 ml de suero fisiológico, mientras que el material de protección fue disuelto en forma separada en

400 ml de suero fisiológico, una vez que ambas soluciones fueron homogéneas se procedió a mezclarlas y dejarlas reposar en el agitador orbital (Nivel 3) por lo menos 30 minutos. Terminado este tiempo, las muestras fueron llevadas al secador por atomización. Las sustancias protectoras usadas, así como las correspondientes concentraciones, se detallan en la tabla 4.8.

Tabla 4.8. Concentración en g/L de sustancias usadas como protección en el caldo de fermentación centrifugado como preparación para el secado por atomización de *Lactobacillus plantarum*.

	Lactosuero (W)	Maltodextrina (M)	Leche descremada (SM)	Goma arábica (Ga)	Pectina (Pe)
W	250	-	-	-	-
WM	162.5	87.5	-	-	-
MSM	-	87.5	162.5	-	-
WMGa	137.5	75	-	37.5	-
WMPe	160	83.75	-	-	6.25

Cuando el caldo de fermentación no fue centrifugado, las sustancias protectoras se agregaron directamente al caldo en la misma concentración (20%p/p). La mezcla se homogenizó y se esperó por lo menos 30 minutos antes de llevarla al secador por atomización. La tabla 4.9 muestra las sustancias usadas en este caso

Tabla 4.9. Concentración g/L de sustancias usadas como protección en el caldo de fermentación sin centrifugar como preparación para el secado por atomización de *Lactobacillus plantarum*.

	Lactosuero (W)	Proteína de lactosuero (WP)	Glutamato monosódico (G)	Fructosa (F)	Sacarosa (S)	Sorbitol (So)
W	250	-	-	-	-	-
WP	-	250	-	-	-	-
WPG	-	237.5	12.5	-	-	-
WPGF	-	225	12.5	12.5	-	-
WPGS	-	225	12.5	-	12.5	-
WPGSSo	-	212.5	12.5	-	12.5	12.5

En todos los casos, una vez que se obtuvo una suspensión homogénea compuesta por las bacterias y los materiales de protección, se tomó una muestra para cuantificar la concentración de microorganismos

viabiles antes del secado (BD), asimismo, una vez finalizado el secado se tomó muestra del producto deshidratado a la cual también se le hizo recuento (AD) y se le midió humedad.

4.2.7 Pruebas de estabilidad post secado

Una vez que se ha obtenido el producto deshidratado es necesario evaluar si el mismo sigue poseyendo las mismas características de interés que tenía la cepa fresca. Por tal motivo se aplicaron una serie de pruebas tendientes a verificar el crecimiento, la capacidad de acidificar el medio, la resistencia a altas temperaturas y a condiciones ácidas (pensando en el paso por el tracto gastrointestinal) y en última instancia la capacidad de inhibir una cepa patógena (*Yersinia ruckeri*). Para finalizar, se hizo un seguimiento durante el almacenamiento a fin de evaluar como afectaba la temperatura y el medio de protección a su estabilidad.

4.2.7.1 Cinéticas de crecimiento y acidificación de *Lactobacillus plantarum* LPS47

En matraces de 200 ml, conteniendo el medio de cultivo tradicional, se inocularon en forma separada la cepa fresca así como también producto deshidratado. En ambos casos se tuvo cuidado de partir con una concentración inicial de 10^5 UFC/ml. Durante un periodo de 24 - 32 horas, y cada 3 horas, se hizo recuento de microorganismos viables y se midió el pH. Las cinéticas de crecimiento fueron modeladas por la ecuación de Gompertz (ec. 4.1)

$$\ln\left(\frac{UFC}{UFC_0}\right) = A \exp\left\{-\exp\left[\left(\frac{\mu_m \cdot \exp(1)}{A}\right)(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (4.1)$$

En la ecuación 4.1, N son las UFC/ml a un tiempo arbitrario, t , N_0 son las UFC/ml iniciales, μ_m es la velocidad máxima de crecimiento, λ y A , son el tiempo de latencia y la concentración de microorganismos en fase estacionaria respectivamente.

De igual forma, el pH del medio se midió cada tres horas durante el transcurso de la fermentación de forma de estudiar el comportamiento acidificante de la cepa deshidratada en comparación a la cepa fresca.

4.2.7.2 Resistencia de la cepa a altas temperaturas

Se prepararon viales con 25 ml de agua – peptona (0.1%) estériles y en ellos se puso la cantidad de cepa (fresca o deshidratada) suficiente para lograr una concentración inicial de $\sim 10^8$ UFC/ml. Cada uno de estos viales fue puesto en un baño termostático a temperaturas de 40, 50, 55 y 60 °C.

Independiente de la temperatura se esperaron 15 minutos a fin de que el vial alcanzara equilibrio térmico con el baño termostático y posterior a ello se procedió a ir tomando muestras (para recuento de microorganismos) en el tiempo de acuerdo al protocolo descrito en la tabla 4.10.

Tabla 4.10. Protocolo de toma de muestras para evaluar resistencia térmica de *L. plantarum* autóctono.

Temperatura		Tiempo transcurrido, min							
40	0	10	20	30	40	50	60	-	-
50	0	5	10	15	20	25	30	40	60
55	0	5	10	15	20	25	30	35	40
60	0	2	4	6	8	10	15	20	25

Al momento de tomar las muestras estas fueron puestas de inmediato en un baño de agua-hielo a fin de detener la reacción. El análisis de la mismas se llevó a cabo lo más rápido posible, sin embargo, cuando esto no fue posible la muestra se dejó a 4°C y fue analizada durante el transcurso de las dos horas siguientes.

4.2.7.3 Resistencia de la cepa a condiciones ácidas

En su paso por el tracto gastrointestinal los microorganismos se ven expuestos a una serie de condiciones adversas que deben sortear si es que desean ejercer el efecto protector (en el caso de los probióticos) para el cual han sido incorporados al huésped. Una de estas variables es la acidez, por tanto para verificar esto con los productos deshidratados obtenidos, se tomaron muestras de los mismos así como de la cepa fresca y fueron puestas (Concentración inicial $\sim 10^7$ UFC/ml) en matraces de 35 ml con agua – peptona (0.1%) a tres condiciones distintas de acidez, esto fue pH=2.0; 4.0 y 6.5. Durante el transcurso de 4 horas se tomaron muestras (cada hora) de cada uno de los matraces y se les hizo recuento de microorganismos viables.

4.2.7.4 Cinética de inhibición de *Yersinia ruckeri*

A fin de comparar las capacidades probióticas de la cepa *Lactobacillus plantarum* deshidratada y de otra proveniente de ceparío (fresca) se analizó el efecto que ambas tenían en el crecimiento de *Yersinia ruckeri*, una cepa patógena típica en salmones. La cinética de inhibición se llevó a cabo en caldo CASO tripticasa en un periodo de 48 horas a 25°C tomado muestras cada 5 – 6 horas aproximadamente. El conteo de microorganismos patógenos viables se llevó a cabo en placas de Tripticasa-Agar a las cuales se les agregó cristal violeta al 1% de forma de hacer más fácil la visualización de los microorganismos.

4.2.7.5 Estabilidad de *Lactobacillus plantarum* deshidratado durante almacenamiento

Cuando el cultivo se llevó a cabo bajo condiciones de estrés osmótico el almacenamiento se llevó a cabo solamente a 4°C dado que no se sabía cuál iba a ser el comportamiento de las microcápsulas y por tanto esta era la condición más favorable en términos de temperatura ambiental para la mantención de las bacterias. Durante un periodo de 10 semanas se hizo recuento del producto deshidratado y a partir de estos resultados se evaluó el efecto del estrés salino y de un grupo de materiales de encapsulación en el almacenamiento (tabla 4.9). Los resultados obtenidos arrojaron luces sobre la resistencia de la cepa, por tanto, se decidió que en los siguientes ensayos el almacenamiento se haría a temperaturas más elevadas y además, en lo posible, por una mayor cantidad de tiempo.

En base a lo anterior, en los ensayos siguientes cada una de las muestras recolectadas del secador fue dividida en tres y almacenada a temperaturas de 4, 25 y 37°C sin control de humedad ambiental. Semanalmente a cada una se le hizo recuento de microorganismos. Los datos recolectados sirvieron para elaborar gráficas $\log N/N_0$ (donde N es el conteo bacteriano existente a un tiempo cualquiera y N_0 corresponde al conteo al inicio del almacenamiento) versus tiempo. A partir de los gráficos fue posible obtener la constante de inactivación, k para cada una de las condiciones de almacenamiento y definir que mezcla de sustancias era capaz de brindar una mayor vida de estante al producto final (Sunny – Roberts y Knorr, 2009; Yin *et al.* 2010)

4.2.8 Pruebas a mayor escala

4.2.8.1 Ensayo escala piloto

Se realizaron dos cultivos de 20 L cada uno para luego:

- a. Concentrar biomasa mediante membrana de microfiltración. Recolectar concentrado y agregar la mezcla de materiales de protección que dio los mejores resultados en términos de estabilidad durante el almacenamiento, esperar a lo menos una hora para su disolución total ya que de considerar menos tiempo se corre riesgo que queden grumos que posteriormente afecten el adecuado funcionamiento de la boquilla del secador y pongan en riesgo la operación.
- b. Agregar directamente los materiales de protección al caldo de cultivo, disolver y esperar por una hora bajo agitación hasta lograr una suspensión homogénea.

Posteriormente, en ambos casos, se llevó la suspensión al secador por aspersion y se secó de acuerdo a las condiciones óptimas encontradas a partir de los ensayos realizados en el ítem 4.2.5.2, esto es, presión de atomización de 2 bar, temperatura de salida de 70°C (Flujo de alimentación ~70-80 ml/min).

Se hizo recuento de microorganismos viable una vez finalizado el cultivo, al concentrado obtenido de la membrana y al producto deshidratado inmediatamente finalizado el secado.

4.2.8.2 Ensayo escala semi - industrial

Este ensayo se llevó a cabo en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) perteneciente a la Universidad Austral de Chile (UACH).

Se hizo un cultivo de 120 L y al cabo de 24 horas se procedió a agregar la mezcla encapsulante, se agitó alrededor de una hora y fue llevada al secador. Por tratarse de un equipo de características diferentes al que se realizaron las pruebas a escala piloto, las condiciones de secado también variaron, en ese sentido la temperatura de entrada sólo alcanzó los 150°C, y por otro lado, la temperatura de salida tuvo que aumentarse hasta 75°C de forma de permitir que el producto pusiera descolgarse de forma adecuada. El producto en polvo fue recuperado desde el ciclón y desde la torre y se envasó separadamente a fin de medir humedad y hacer recuento de microorganismos viables.

4.2.9 Análisis

4.2.9.1 Relacionados con el cultivo

Viabilidad

El conteo de microorganismos viables se llevó a cabo de acuerdo al método estándar de conteo en placas MRS agar. Las placas fueron incubadas durante 48 h a 25°C o a 32°C dependiendo bajo que condiciones de temperatura se efectuó el cultivo. La concentración de microorganismos se obtuvo a partir de la siguiente fórmula. En todos los ensayos, a menos que se diga lo contrario, las placas se sembraron en duplicado.

$$\left[\frac{UFC}{ml} \right] = \frac{\sum n_i}{m_1 \cdot 1 + m_2 \cdot 0.1 + m_3 \cdot 0.01 + \dots +} \cdot (\text{menor dilución contable}) \cdot \frac{1000}{50} \quad (4.2)$$

En la ecuación (4.2) n_i son las colonias contadas en todas las placas que exhibieron entre 10 y 300 colonias (lo cual se considera confiable). Los m_i se refieren al número de placas efectivamente contadas por cada dilución. Entre menor la dilución tiene mayor ponderación. Para un ejemplo de cálculo dirigirse al apéndice F.

Peso seco

Se hizo crecer la cepa LPS 47 en el medio tradicional (1 L) y se tomaron muestras del caldo de fermentación cada tres horas. Para cada punto se midió la densidad óptica (DO_{625}), la viabilidad y además se transfirieron 30 ml de caldo a tres tubos falcon para centrifuga de 15 ml cada uno (10 ml de caldo en cada tubo), posteriormente los tubos se centrifugaron (5000 rpm por 10 min) y se descartó el sobrenadante, el pellet se lavó dos veces más con suero fisiológico y finalmente el pellet remanente se llevó a una estufa a 105°C por dos horas. Finalizado este tiempo, las muestras se dejaron en un desecador hasta que se enfriaron y posteriormente se pesaron. Anterior a la realización del ensayo se contaba con el gramaje de todos los tubos falcon vacíos, por tanto de la diferencia de masas se obtuvo la cantidad de sólidos presentes en los 10 ml de caldo de fermentación. Las concentraciones de sólido se correlacionaron con la densidad óptica, de acuerdo a lo que se muestra en la ecuación 4.3

$$Biomasa \left[\frac{g}{L} \right] = 0.232 \cdot DO_{625} + 0.028 \quad (4.3)$$

Glucosa

Se utilizó el kit enzimático - colorimétrico Glucose-Liquicolor de Human, Alemania. La glucosa se determina después de la oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado reacciona bajo catálisis de la peroxidasa con fenol y 4-amino fenazona produciendo un complejo rojo-violeta usando la quinoneimina como indicador. La intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa de la muestra. Toda la reacción se produce en un lapso de 5 minutos a 37°C y el compuesto coloreado se mide a una longitud de onda de 500 nm.

Ácido láctico

Se utilizó el kit enzimático – colorimétrico Lactate Dry-Fast de Sentinel Diagnostics, Italia. El lactato presente en la muestra es oxidado por lactato-oxidasa a piruvato y peróxido de hidrógeno, el cual, en presencia de peroxidasa (POD), reacciona con n-etil-n-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilanilina (TOOS) formando un compuesto, cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de lactato en la muestra examinada. Toda la reacción se produce en un lapso de 10 minutos a 37°C y el compuesto coloreado se mide a una longitud de onda de 550 nm.

4.2.9.2 Relacionados con la separación por membranas

Tamaño de bacteria

Se tomó una muestra de caldo de cultivo, se centrifugó y posteriormente el pellet resultante fue lavado dos veces con suero fisiológico. Después del último lavado, la muestra fue llevada al microscopio electrónico de transmisión (JEM 1200 EXII) el cual se contaba con una cámara acoplada modelo Erlangshen ES500W. Los datos obtenidos fueron procesados con el software Gatan, Inc. (Reino Unido).

Viscosidad del permeado

Se tomó una muestra del permeado y se llevó al viscosímetro Brookfield usando el spin S-00. La viscosidad se midió usando una velocidad de 60 rpm y a una temperatura de $18 \pm 2^\circ\text{C}$.

Viabilidad

Para el recuento de microorganismos tanto en el permeado como en el concentrado se siguió el procedimiento detallado en 4.2.9.1.

Ácido láctico

Análogo al detallado en 4.2.9.1



4.2.9.3 Relacionados con el secado

Viabilidad

Antes del secado, la viabilidad del caldo en presencia de los aditivos (con o sin centrifugación) se calculó de igual forma que lo mencionado en el punto 4.2.9.1, pero para hacer los resultados comparables con el recuento después del secado se consideró

$$\left[\frac{UFC}{g} \right] = \frac{[UFC/ml]}{0.25(g/ml)} \quad (4.4)$$

Donde 0.25 g/ml correspondió a la concentración de sólidos presentes correspondientes a los materiales de protección agregados en forma previa al secado.

Después del secado, se pesó un tubo conteniendo 4 ml de buffer fosfato (PBS) y al mismo se agregaron alrededor de 0.5 g de producto deshidratado. Se disolvió mediante agitación en vortex y se dejó reposar por lo menos 15 minutos, transcurrido ese tiempo se procedió a agitar nuevamente el tubo para terminar de disolver cualquier sólido que hubiese quedado y se pesó el tubo nuevamente.

Posteriormente, se siguió con el método estándar de sembrado en placas, tomando como muestra para hacer las diluciones los tubos de PBS conteniendo el material deshidratado ya disuelto. Las placas fueron incubadas en atmósfera aeróbica, por 48 h. La viabilidad se informó en UFC/g (ec. 4.5).

$$\left[\frac{UFC}{g} \right] = \frac{[UFC/ml]}{[(Masa\ PBS + polvo - Masa\ PBS)/4](g/ml)} \quad (4.5)$$

Daño membrana celular

Se siguió la metodología de Gardiner *et al.* (2000), quien determinó que el daño en la membrana celular estaba relacionado con la sensibilidad de la muestra al NaCl. En función de esto, las soluciones de PBS con las bacterias deshidratadas resuspendidas que fueron preparadas para medir la viabilidad en forma posterior al secado, fueron usadas también para hacer este test, que consistió en sembrar las mismas diluciones usadas en el punto 4.2.9.3 pero ahora en placas de MRS-NaCl-Agar (Ver 4.1.3.1). Las placas se contaron después de tres días de incubación a 37°C y tanto el recuento de microorganismos como el tamaño de las colonias fueron comparados con los resultados del sembrado de las diluciones en las placas que no contenían NaCl.

Rendimiento

Para calcular el rendimiento la masa del producto deshidratado se dividió por la masa total de sólidos alimentados al secador por atomización. Los resultados fueron expresados en porcentaje.

Humedad

El contenido de humedad se midió poniendo una muestra de aproximadamente 2 g de producto deshidratado en la balanza medidora de humedad (ver 4.1.4). En ésta la muestra se secó a 105°C hasta alcanzar peso constante. Los resultados se expresaron en porcentaje.

Tamaño de partícula: La distribución de tamaño de partículas del producto deshidratado fue obtenida con el analizador Microtrac usando aire como fluido de transporte para las microcápsulas y un índice de refracción 1.000.

Caracterización microcápsulas

La morfología de las partículas así como un estimado de su tamaño fue obtenida mediante fotografías SEM con ayuda del microscopio de barrido (EO JSM 380).

Mojabilidad

Se utilizó la técnica de ascenso capilar acoplada con la teoría de Washburn (1921) usando hexano y agua como solventes.

Isotermas de adsorción

Se prepararon soluciones saturadas de sales y se almacenaron en recipientes herméticos, a 25 y 37°C, a fin de generar determinadas condiciones de humedad relativa (Ver Apéndice C). En los recipientes se guardó el producto deshidratado y se tomaron muestras del mismo en un intervalo de tiempo hasta que la humedad del producto se mantuvo constante. Los valores de humedad y actividad de agua se llevaron a un gráfico y se les ajustó el modelo de BET.

$$X = \frac{B \cdot X_m \cdot a_w}{[(1 - a_w) \cdot (1 + (B - 1)X_m)]} \quad (4.6)$$

En la ecuación 4.6 B es una constante, X y X_m son los contenidos de humedad en el equilibrio y de la monocapa respectivamente (en base seca) y a_w es la actividad de agua.

4.2.9.4 Análisis estadístico

Los resultados presentados en este trabajo son el promedio de dos experimentos independientes. La comparación entre grupos fue hecha con el test de Tukey de comparaciones múltiples usando el software SPSS de IBM. Las diferencias fueron estadísticamente significativas con un valor $p < 0.05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Selección de cepa probiótica

La cepa *Lactobacillus plantarum* autóctona utilizada en este estudio demostró tener todas las características necesarias para ser listada como probiótico de acuerdo a lo señalado por Kosin et al. (2006).

Bioseguridad: De acuerdo a pruebas API la cepa ha sido reconocida como *Lactobacillus*, organismos que son calificados por la OMS como GRAS (Generally Recognized As Safe),

Origen: La cepa ha sido aislada desde salmones de la X región y se busca que sean usados como probióticos en organismos de la misma especie.

Resistencia: De acuerdo a pruebas realizadas por el grupo de Biología Marina *L. plantarum* LPS47 fue capaz de mostrar antagonismo en presencia de cepas de *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophyla*, *Aeromonas salmonicida*, *Streptococcus focae*, *Micrococcus luteus* y *Vibrio anguillarum*.

Adherencia y colonización: Las pruebas de hidrofobicidad revelaron que la cepa posee una adherencia media de alrededor de un 42%. En relación a la autoagregación, ésta fue de 15%.

Actividad antimicrobiana: Si bien la cepa no es capaz de producir peróxido de hidrógeno y no se le encontró ningún tipo de bacteriocina asociada, es capaz de generar acidez en el ambiente hasta alcanzar un pH cercano a 3.4, esto último resulta ser inhibitoria para una amplia variedad de microorganismos patógenos.

Inmunomodulación: Bioensayos preliminares demostraron que la cepa no produjo cambios en los recuentos de eritrocitos y leucocitos. Si se manifestó un aumento en el estallido respiratorio.

El último punto, que se refiere a viabilidad/supervivencia y resistencia durante el procesamiento, es lo que se busca validar en los siguientes puntos.

5.2 Modos de Cultivo¹

5.2.1 Cultivo en modo discontinuo

Para el cultivo discontinuo se probaron las alternativas con y sin control de pH, en ambos casos se midió el consumo de glucosa, la producción de ácido láctico y la viabilidad durante el cultivo. Los resultados se exponen en las figuras 5.1 y 5.2.

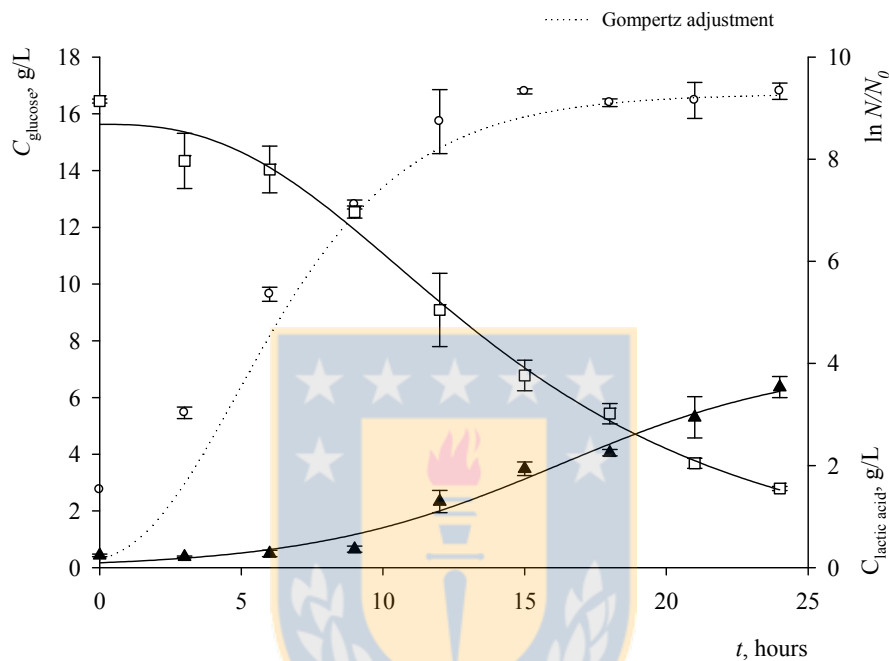


Figura 5.1. Cinética de crecimiento (○) y perfiles de concentración de glucosa (□) y ácido láctico (▲) de *Lactobacillus plantarum* LPS 47 cultivada en modo discontinuo sin control de pH.

De este tipo de ensayos, se desprende el conocimiento básico necesario para el uso de cualquier cepa en un proceso productivo. Para la que nos interesa en este estudio, LPS 47, en la primera figura es posible ver que posee una fase de latencia de al menos una hora, seguida por una fase exponencial que se extiende aproximadamente hasta las 18 horas, momento en el que se inicia la fase estacionaria de crecimiento, la que se ha observado puede durar hasta pasadas las 36 horas de cultivo. Dado que se desea que la bacteria sea capaz de resistir de la mejor forma el proceso de secado, la cosecha debe realizarse durante esta fase (Teixeira *et al.* 1995), lo que se traduce en que se deben considerar por lo menos 20 horas para el cultivo.

¹ Paola Bustos y Rodrigo Bórquez. (En preparación – Bioresource Technology) Batch, fed - batch and continuous culture of an autochthonous probiotic strain. Use of cheese whey permeate as carbon source.

La curva de producción de ácido láctico corrobora lo que ya se sabe de estos microorganismos, que tiene que ver con que la producción de este metabolito está sólo semi-asociada al crecimiento (Luedeking y Piret, 1959). Dado que esta especie tiende a inhibirse en presencia de acidez excesiva, un segundo paso en este estudio consistió en mantener una condición constante de pH en el medio (5.5 ± 0.2), los resultados se muestran en la figura 5.1.2.

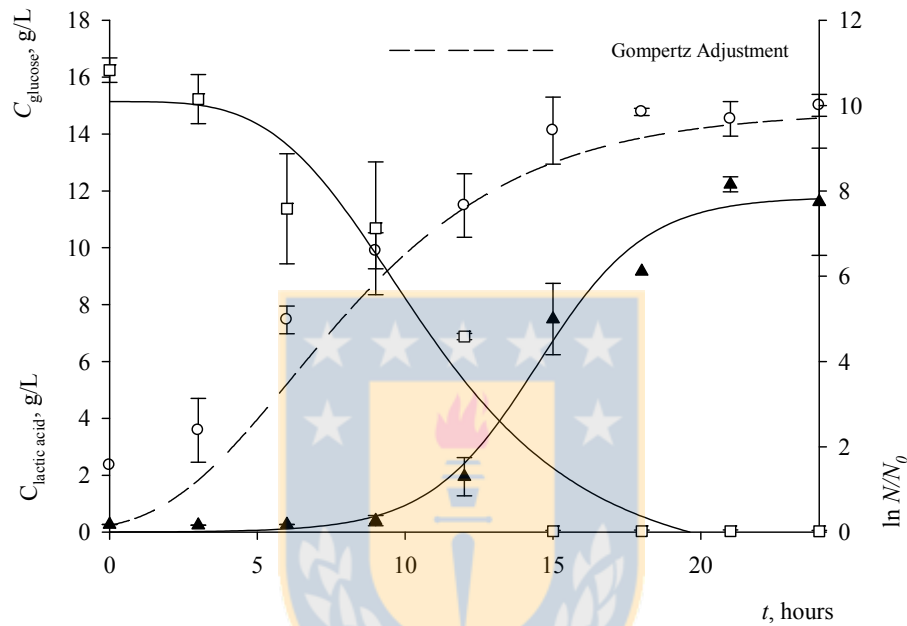


Figura 5.2. Cinética de crecimiento (○) y perfiles de concentración de glucosa (□) y ácido láctico (▲) de *Lactobacillus plantarum* LPS 47 cultivada en modo discontinuo con control de pH.

Lo primero que llama la atención es el aumento en la concentración de ácido láctico al cabo de las 24 h de cultivo (ver tabla 5.1), además, contrario a lo que ocurrió sin control de pH, la glucosa fue utilizada completamente durante el cultivo. El hecho que la acidez del medio fuera neutralizada, permitió a las bacterias no estresarse en ese sentido, y por tanto seguir produciendo ácido hasta el punto en que agotaron las fuentes de carbono disponibles. La productividad de ácido láctico bajo esta condiciones resultó ser casi 4.5 veces mayor que para el cultivo en modo discontinuo sin control de pH. El rendimiento producto/sustrato también se vio favorecido una vez que se mantuvo el pH.

En cuanto a la viabilidad, si bien hubo diferencias entre ambas condiciones estas no fueron estadísticamente significativas, este comportamiento no es tan común ya que, tal como se mencionaba

anteriormente, la gran mayoría de las bacterias pertenecientes a esta especie son más bien sensibles, por tanto se esperaba una mejora notable en términos de la viabilidad una vez que se hubo controlado el pH.

Tabla 5.1. Resumen de variables de interés productivo en cultivo en modo discontinuo de *L. plantarum* LPS 47 asociado a las operaciones con y sin control de pH.

	Características Biomasa	Modelo de	Ácido láctico,	Productividad	Productividad	Rendimientos
	Viabilidad, log UFC/ml	Gompertz	g/L	g_{biomasa}/(L· h)	g_{ac.láctico}/(L· h)	
	Concentración, g/L					
Sin control pH	9.46 ± 0.20	A= 9.28	3.5	0.052	0.096	Y _{XS} = 0.13
	1.77	$\mu_{max}=1.00$				Y _{PS} = 0.24
		$\lambda=1.47$				
Control pH	9.96 ± 0.34	A=9.86	14.7	0.060	0.48	Y _{XS} = 0.13
	2.09	$\mu_{max}=0.84$				Y _{PS} = 1.05
		$\lambda=1.87$				

Así como la viabilidad, la concentración de biomasa tampoco se vio afectada por el control de pH y sólo se observó un leve aumento, los rendimientos en un caso u otro son prácticamente iguales. En comparación a los resultados exhibidos por otras bacterias ácido lácticas y cultivadas usando el mismo tipo de sustrato (Amrane, 2001; Mondragón – Parada, 2006; Aguirre, 2010), la cepa LPS47 tiene características acidorresistentes que le permiten crecer y multiplicarse aún bajo condiciones adversas en términos de acidez. En este punto, se puede pensar que de esta bacteria en particular podría esperarse una buena tolerancia a la estabilización mediante empleo de altas temperaturas, esto porque la exposición a estrés ácido está también relacionado con la sobre expresión de proteínas que a la larga brindan protección frente a altas temperaturas (Teixeira *et al.* 1994; Kim *et al.* 2001).

5.1.2 Cultivo semicontinuo

El cultivo fed – batch, tal como ya se ha mencionado ha sido utilizado con éxito en varias especies de bacterias ácido lácticas (Ding y Tan, 2006; Aguirre, 2010). Las estrategias son variadas y dependiendo de ellas son los resultados obtenidos.

La figura 5.3 muestra la variación en la concentración de biomasa en función del tipo de sustrato utilizado (dado en tabla 4.5, apartado metodología).

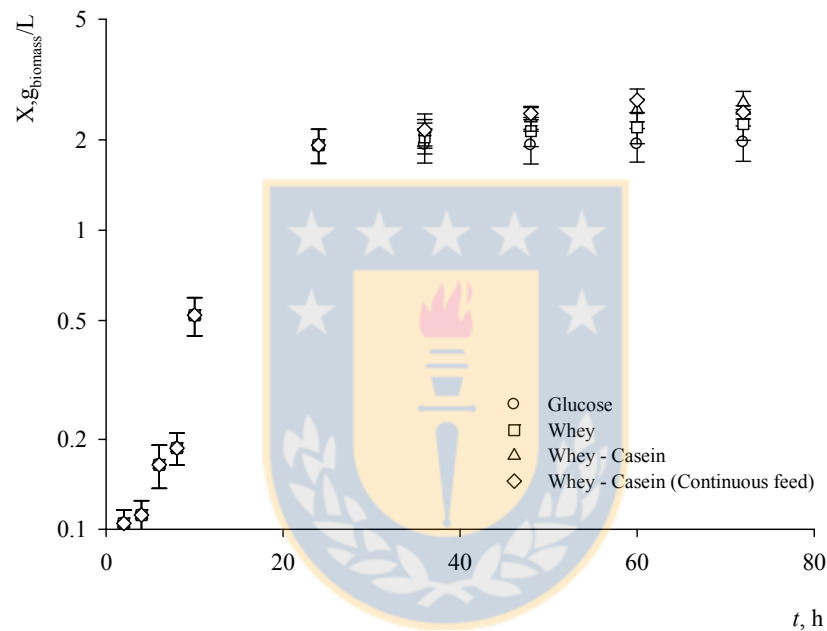


Figura 5.3. Perfiles de concentración de biomasa para *Lactobacillus plantarum* LPS 47 cultivada en modo fedbatch.

Hasta las 24 horas se llevó a cabo el cultivo en modo discontinuo, cumplido este tiempo, se alimentó el reactor de acuerdo a la estrategia seleccionada hasta completar 72 horas de cultivo. Los resultados mostrados en la figura dan cuenta que la operación es factible bajo estas condiciones, sin embargo, la concentración de biomasa, si bien aumenta, no lo hace de forma dramática, como ha sido reportado por ejemplo, por Aguirre (2010) o Hwang *et al.* (2011). El análisis estadístico revela que en cuanto a la producción de biomasa las diferencias estadísticamente significativas estuvieron dadas por el uso de peptona de caseína y no por la forma de administración del sustrato, es así como el lactosuero y la glucosa quedaron en el mismo lugar mientras que el uso de la mezcla lactosuero – peptona de caseína (Whey – Casein) fueron los que dieron los mejores resultados. Esto último se explica considerando que

la peptona de caseína es una buena fuente de aminoácidos lo cual en conjunto a la mezcla compleja de proteínas, lípidos y minerales que es el lactosuero confiere a los microorganismos una excelente fuente de mantención y crecimiento. Ahora bien, junto con que un cultivo cuente con una adecuada concentración de biomasa, ésta debe encontrarse viable, en este caso, la variación de la viabilidad a lo largo de las 72 horas de cultivo se muestran a continuación.

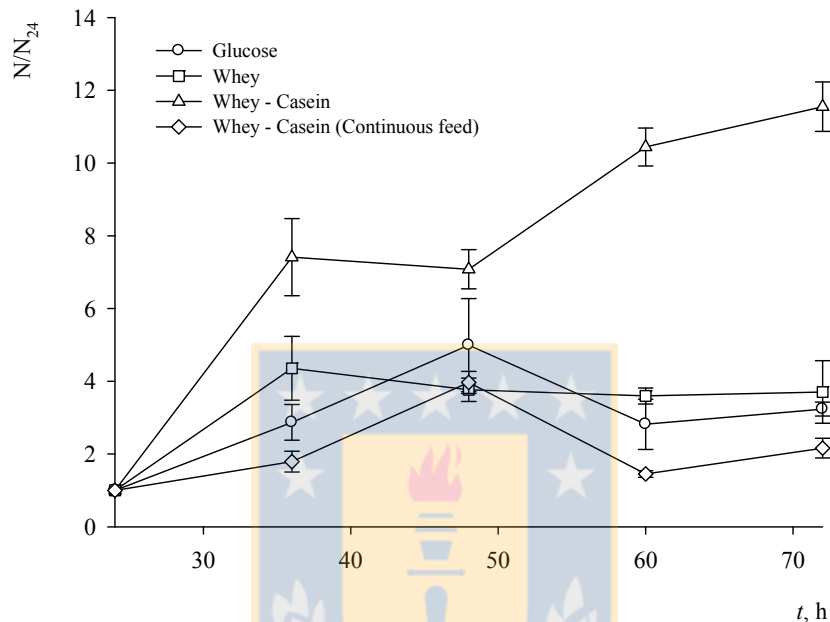


Figura 5.4. Evolución de la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* LPS 47 cultivado en modo fedbatch relativo a la viabilidad al finalizar el modo batch (N_{24}).

Contrario a lo que ocurrió con la concentración de biomasa, en términos de viabilidad las diferencias entre los sustratos fueron más notorias, destacándose de igual forma el uso del sustrato 3 (Whey-Casein) con el cual se consiguió un aumento relativo en el recuento de 13 veces, pasando de $1.5 \cdot 10^9$ UFC/ml al final del periodo discontinuo a $2.0 \cdot 10^{10}$ UFC/ml al alcanzar las 72 horas de cultivo. En términos generales, la alimentación continua del sustrato 3 se tradujo en mantener el balance celular, con un recuento que pasó de $9.8 \cdot 10^9$ UFC/ml a $1.2 \cdot 10^{10}$ UFC/ml al finalizar el proceso. Los sustratos 1 y 2 lograron también hacer diferencias en el recuento de microorganismos, pero sólo en las primeras 24 – 48 horas, después de esto prácticamente no hubo variaciones, especialmente usando glucosa, cuyo recuento final fue de $5.6 \cdot 10^9$ UFC/ml.

Durante el tiempo en que el sistema se operó en forma semi-continua la concentración de glucosa al interior del fermentador fue nula o bien tan baja que fue imposible de medir con el método tradicional enzimático. Este tipo de comportamiento es lo que se espera de un cultivo en modo fedbatch, dado que

en la medida que el sustrato va siendo agregado va siendo consumido, el hecho que no se acumule en el sistema tiene sus ventajas, especialmente cuando un exceso de él pudiera ser tóxico o diera lugar a los microorganismos a tomar rutas metabólicas alternativas a las de el metabolito que pudiera interesarnos.

Tabla 5.2. Resumen de variables de interés productivo en cultivo en modo fedbatch de *L. plantarum* LPS 47 para distintos sustratos y estrategias de alimentación.

	Viabilidad log UFC/ml	Biomasa g/L	Ácido láctico, g/L	Productividad g_{biomasa}/(L· h)	Productividad g_{ac.láctico}/(L· h)
Glucosa	9.75 ± 0.01	1.96	20.6 ± 4.1	0.030	0.12
Lactosuero	9.97 ± 0.08	2.26	20.0 ± 2.0	0.036	0.10
Lactosuero – Peptona caseína	10.12 ± 0.36	2.67	30.0 ± 3.4	0.045	0.31
Lactosuero – Peptona caseína (Alimentación continua)	10.22 ± 0.17	2.47	41.0 ± 4.7	0.041	0.54

En lo que respecta a la tabla 5.2, se observa un aumento en la concentración de ácido láctico para la cuarta condición, coincidentemente con que es la condición donde se observó sólo una mantención en la cantidad de microorganismos y no un aumento en los mismos. La productividad volumétrica en este caso es mayor que la observada para el cultivo en modo discontinuo, incluso cuando hubo control de pH, luego, si lo que se desea es producir ácido láctico habrá que operar el bio-reactor bajo estas condiciones.

Tal como ya se había mencionado, contrario a lo que señalan Aguirre et al. (2010) en nuestro caso no se observaron aumentos en la productividad de biomasa, de hecho hubo una disminución considerable de la misma, ahora bien, Aguirre et al. reportan una viabilidad de $2.0 \cdot 10^{10}$ UFC/ml al finalizar el proceso después de 40 horas de operación, en esta tesis dicha viabilidad se mantiene incluso después de 72 horas de cultivo y lo que llama aún más la atención es que ha sido posible haciendo recambios cada 12 horas de sólo 1/15 avo del volumen total de cultivo, sin necesidad de parar la operación, lo contrario del trabajo de Aguirre donde se hicieron reemplazos de 1/4 del volumen de cultivo previa espera de la sedimentación de biomasa.

5.1.3 Cultivo continuo

La última parte de esta etapa consistió en el cultivo continuo de la cepa a diferentes tiempos de residencia. En todos los casos estudiados el estado estacionario se alcanzó rápidamente, de hecho después de 4 tiempos de residencia las concentraciones de biomasa, glucosa y ácido láctico no variaron más allá de un 15%. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.3.

Tabla 5.3. Resumen de variables de interés productivo en cultivo en modo continuo de *L. plantarum* LPS 47 para distintos tiempos de residencia. Concentración inicial de glucosa 16 g/L. Los valores informados corresponden una vez alcanzado el estado estacionario.

τ, h	D, h^{-1}	Viabilidad, UFC/ml	Biomasa g/L	Ácido láctico, g/L	Productividad $\frac{g_{biomasa}}{L \cdot h}$	q_s $\frac{g_{sustrato}}{g_{biomasa} \cdot h}$	q_p $\frac{g_{ác.láctico}}{g_{biomasa} \cdot h}$
4	0.250	9.88 ± 0.03	1.44	6.3 ± 0.01	0.36	1.56	1.04
6	0.167	9.99 ± 0.05	1.67	7.2 ± 0.43	0.28	1.35	0.69
8	0.125	10.71 ± 0.23	1.88	10.3 ± 0.68	0.24	0.92	0.67
12	0.083	10.13 ± 0.01	2.01	11.6 ± 0.16	0.17	0.58	0.47

Las tasas de consumo de sustrato (q_s) permitieron estimar un rendimiento biomasa/sustrato de un 17% con un coeficiente de mantención de 0.19 $g_{biomasa}/(g_{sustrato} \cdot h)$. En relación al ácido láctico, las tasas de producción del metabolito (q_p) se ajustaron de buena forma ($r^2=0.9605$) a la ecuación de Luedeking y Piret (1959), desprendiéndose de la misma que la cantidad de ácido asociada al crecimiento celular era de 3.3 $g_{ácido}/g_{biomasa}$ mientras que la porción no asociada al crecimiento alcanzó 0.20 $g_{ácido}/(g_{biomasa} \cdot h)$.

En cuanto a la productividad volumétrica de biomasa, bajo cualquiera de las condiciones ensayadas, ésta resultó ser mayor que lo que se había observado en cultivo discontinuo o fedbatch, de hecho, dependiendo del tiempo de residencia, la productividad aumentó hasta 6 veces ($D=0.25 h^{-1}$). El hecho que la operación continua sea más favorable que el cultivo batch, para esta variable, estaría ligado al hecho que el microorganismo usado en este estudio tiene una velocidad de crecimiento relativamente alta (entre 0.8 – 1.0 h^{-1}). Ahora bien, sin desmedro de esto los resultados si uno se detiene a analizar sólo la concentración de biomasa, los resultados obtenidos aquí poco o nada difieren de los que se habían obtenido bajo las otras condiciones de cultivo, de hecho, son incluso más bajas que las reportadas en el caso del cultivo en modo semi – continuo. Junto con esto último la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* durante el cultivo continuo mostró sólo un leve aumento en relación a lo que se tenía al finalizar el cultivo en modo discontinuo. Aún así llama la atención la extraordinaria

capacidad de adaptación de esta cepa, ya que incluso a tiempos de residencia tan bajos como 4 ó 6 horas fue capaz de mantenerse activa, quizá debido a esto mismo su producción de ácido láctico se vio disminuida, ya que en general las respuestas adaptativas de los microorganismos pasan por una serie de cambios a todo nivel a fin de adaptarse a una nueva condición.

Una última cosa a señalar radica en el comportamiento de la concentración de biomasa en función del factor de dilución (inverso del tiempo de residencia).

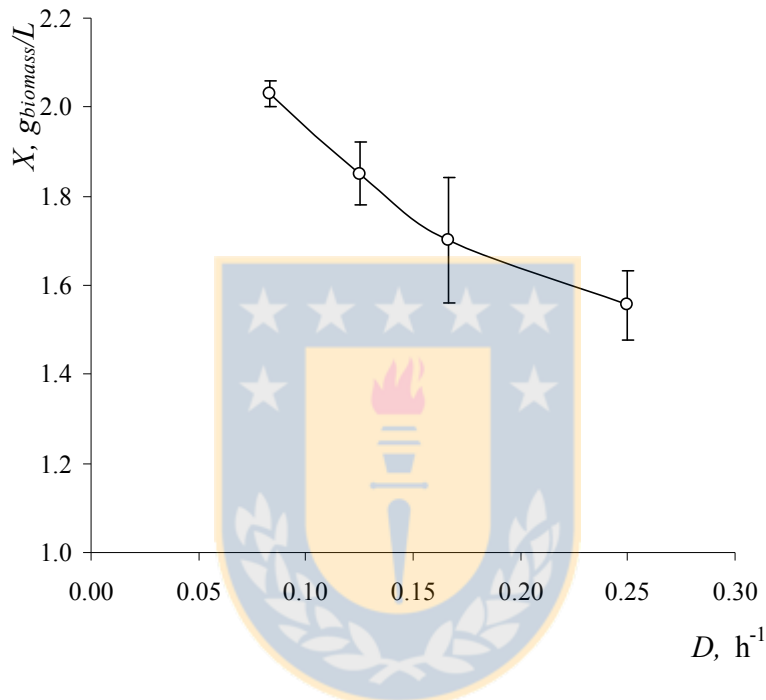


Figura 5.5. Comportamiento de la concentración de biomasa de *Lactobacillus plantarum* LPS 47 cultivado en modo continuo en función del factor de dilución.

El comportamiento exhibido por la bacteria da luces de un tipo de anomalía encontrada en los cultivos en modo continuo y que guarda relación con el hecho de estar trabajando con un medio complejo (no definido). De acuerdo a lo que señala Wang (1978), en estos casos, en la medida que se varía el tiempo de residencia varían también los requerimientos nutricionales del microorganismo, por tanto es difícil establecer con claridad cual es el nutriente limitante, de hecho, se postula que así como varía la velocidad de crecimiento del organismo varía también la naturaleza del nutriente que limitará el proceso.

5.1.4 Comentarios finales

Tal como ya se había mencionado, el uso de una u otra forma de cultivo estará determinado principalmente por las características del microorganismo y también por lo que se desea a fin de cuentas privilegiar, es decir, si queremos fomentar la producción de biomasa o bien la producción de un metabolito. Por otro lado, como en todo proceso productivo, se debe tener en cuenta cuanto es lo que se tendrá que invertir. En este sentido un cultivo en modo continuo, si bien manifestó la mayor productividad volumétrica en términos de biomasa (32 veces más que en fedbatch y 6 veces más que en modo discontinuo) es mucho más costoso y también riesgoso, costoso en términos de que siempre habrá componentes del medio original de cultivo que no serán completamente utilizados y que por tanto se perderán en la corriente de salida y por otro lado riesgoso ya que no sabemos que puede pasar con la bacteria en la medida que el tiempo de cultivo transcurre, eso implicaría realizar pruebas periódicas que señalen si los microorganismos siguen o no, por ejemplo, manifestando las propiedades probióticas por las que fueron escogidos inicialmente, ya que, como ya se ha dicho, una de la principales desventajas de un cultivo continuo es la mutación.

El modo fedbatch ofrece un buen comportamiento, especialmente en lo que se refiere a la producción de ácido láctico en comparación a lo obtenido en un cultivo discontinuo con control de pH : 44 g/L versus 15 g/L respectivamente. El costo asociado al mismo tampoco pareciera ser excesivo ya que se debe recordar que cada 12 horas lo único que se hizo fue reemplazar 1/15avo del volumen del reactor por medio fresco. Con esto se logró una operación estable por 72 horas. Las desventajas de este modo de operación se relacionan principalmente con que no se sabe si los microorganismos de las 24, 48 ó 72 horas serán los mismos, se debe recordar que en la medida que pase el tiempo existirá mayor estrés al interior del reactor ya que habrá mayor número de microorganismos, mayor cantidad de metabolitos, entre otras cosas, y por tanto, las bacterias que se cosechen podrán exhibir características diferentes o comportamientos diferentes en una operación de secado : menos resistencia, pérdida de características intrínsecas, entre otras. En este aspecto se cree que falta por investigar más en esta área antes de establecer el uso de este tipo de cultivos a una mayor escala, por lo menos en el área de bacterias ácido lácticas, ya que existe suficiente evidencia de su uso exitoso, principalmente con levaduras (Leib *et al.* 2001).

Sin lugar a dudas este trabajo ha dado una pincelada a lo que se puede lograr con una operación de este tipo en este campo, sin embargo, queda todavía mucho por investigar, pasando por ejemplo por las diversas estrategias que existen para la incorporación de la alimentación (e.g. Ding y Tan, 2006), como también por el hecho de decidir que es realmente lo que debemos alimentar para lograr un buen

resultado, ejemplo de esto último es el trabajo de Altamirano *et al.* (2004) donde se dan luces sobre la estrategia de ir alternando fuentes de carbono a fin de permitir la “desintoxicación” de microorganismos productores de ácido láctico, lo cual se traduce en una cosecha de células con mejor crecimiento y viabilidad.

Finalmente, basados en estos criterios se decidió continuar esta investigación utilizando el método tradicional de cultivo discontinuo. Dado que en primera instancia lo que interesa es la concentración de células viables y no la producción de ácido láctico, se optó por mantener el cultivo sin control de pH. La operación de esta forma, además de ser más práctica en términos operacionales pone a la bacteria frente a dos situaciones de estrés: estrés debido al agotamiento de nutrientes (en estado estacionario) y estrés ácido por efecto de la baja de pH. Esto nos será de utilidad durante el proceso de secado ya que se han publicado evidencias de protecciones cruzadas entre estrés térmico y estrés ácido, así lo han señalado también Teixeira *et al.* (1995) y van de Guchte (2002) entre otros.



5.2 Concentración de biomasa²

5.2.1 Tamaño bacteriano

En los procesos de bioseparación partícula – líquido se hace importante conocer ciertas propiedades que permitan dilucidar como separar las moléculas de interés desde el resto del caldo de fermentación. En este caso, se tomaron fotografías de alta resolución a fin de conocer la forma y estimar el tamaño de la bacteria que ocupa nuestro estudio: *Lactobacillus plantarum* LPS 47.

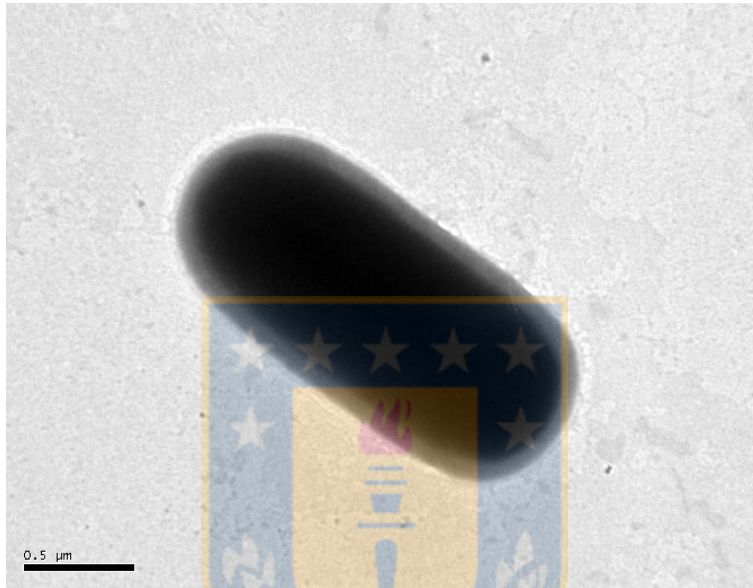


Figura 5.6. Fotografía SEM de *Lactobacillus plantarum* LPS 47.

El análisis de las fotografías tomadas sirvió para realizar distintas tomas y hacer un estimado de las dimensiones de la bacteria, a partir de esto se encontró que tenían $1.56 \pm 0.34 \mu\text{m}$ y $0.82 \pm 0.10 \mu\text{m}$.

5.2.2 Microfiltración

Los ensayos de microfiltración (MF) se llevaron a cabo usando el módulo Carbosep con tamaño de poro nominal igual a $0.14\mu\text{m}$, tamaño que, de acuerdo, a la morfología presentada en la figura 5.6 no debería dejar pasar a los microorganismos, pero que tampoco es tan pequeño que pueda provocar un bloqueo demasiado rápido de los mismos.

En las páginas siguientes se estudia el efecto de las distintas variables en la operación de separación.

² Paola Bustos, Camila Scheel y Rodrigo Bórquez. (En preparación – Journal of Membrane Science). Separation of probiotic strain from fermentation broth using microfiltration and ultrafiltration membranes. Study of operating parameters and fouling.

5.2.2.1 Influencia de la presión transmembrana (PTM)

De forma de conocer el efecto de la presión transmembrana en el flux lo primero fue determinar la presión crítica, es decir, el punto por sobre el cual ya no existirán variaciones en la densidad de flujo independiente de la presión aplicada.

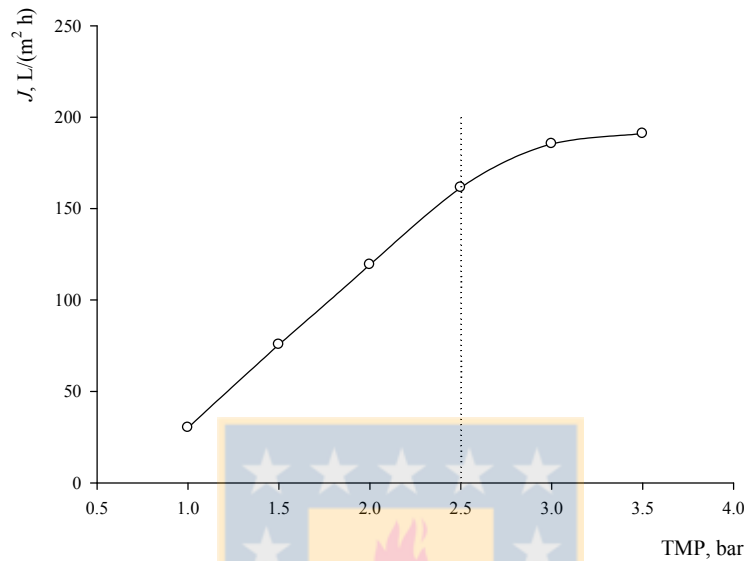


Figura 5.7. Determinación de la presión transmembrana crítica (PTM_c) durante la filtración de *Lactobacillus plantarum* LPS 47 en medio PL a una velocidad tangencial de 4 m/s.

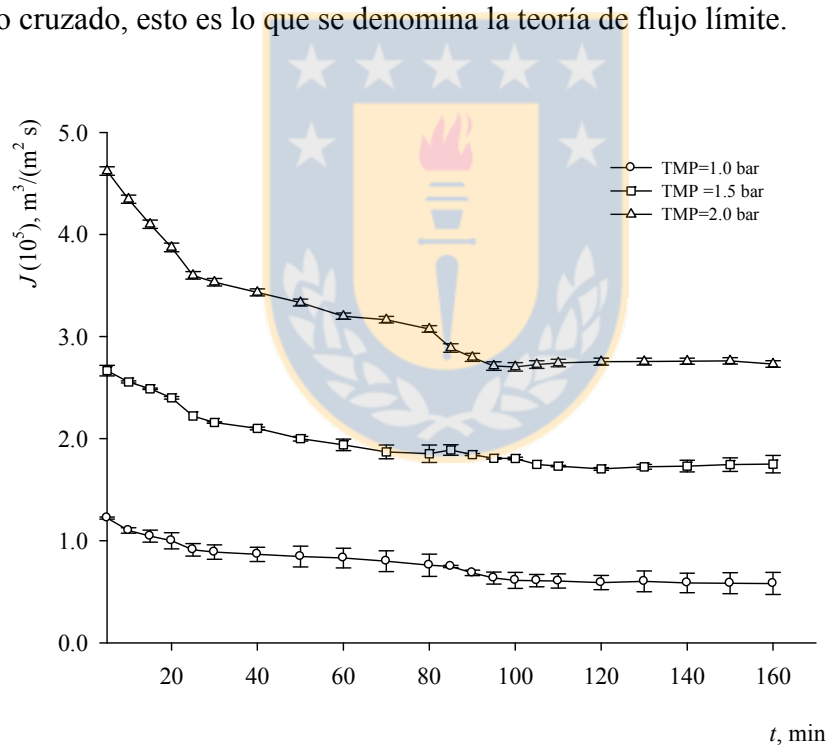
De la figura 5.7 se desprende que $PTM_c \sim 2.5$ bar, luego, debe trabajarse por debajo de este valor a fin de evitar la formación de un queque que a la larga se compactará y hará que la membrana vaya perdiendo su permeabilidad en forma paulatina haciendo la operación menos eficiente o bien que provoque problemas durante el lavado y/o en el peor de los casos que impida su reutilización.

Con esto claro, los siguientes experimentos se llevaron a cabo a presiones transmembrana de 1.0; 1.5 y 2.0 bar. Los resultados (figura 5.8) dan cuenta que en la medida que se aumenta la presión existió un aumento considerable en la densidad de flujo, aún así, al cabo de 20 minutos de operación ya había disminuido considerablemente para todos los casos estudiados. Esto tiene que ver, como bien se sabe por el bloqueo inicial de poros que se produce por efecto de todos los materiales que arrastra el caldo de fermentación (Tanaka *et al.* 1994; Carrere *et al.* 2001). Este bloqueo continúa hasta que se establece el equilibrio entre el material que es arrastrado producto de la velocidad de flujo cruzado y el efecto que ejerce la presión transmembrana (PTM), una vez que esto sucede, se alcanza la condición de flux en estado estacionario. La tabla 5.4 muestra la reducción de flujo en función del flux que se tenía al iniciar la operación.

Tabla 5.4. Reducción de la densidad de flujo en función de la presión transmembrana

PTM, bar	1.0	1.5	2.0
$J_E, \text{m}^3/(\text{m}^2 \text{ s})$	$7.21 \cdot 10^{-6}$	$1.73 \cdot 10^{-5}$	$2.98 \cdot 10^{-5}$
FR, %	36.7	35.1	35.6

De acuerdo a lo que muestra la tabla, independiente de la presión aplicada, la reducción de la densidad de flujo fue más bien constante, lo cual calza con las observaciones realizadas por Buetehorn (2010) quien señala que este parámetro depende más bien de la velocidad tangencial y de la concentración de sólidos más que de la PTM, esto porque en la medida que se aumenta la presión, si bien en un inicio aumentará la densidad de flujo, llegará un punto en que la cantidad de sólidos que se depositen en la membrana también aumentarán, luego el queque aumentará de espesor hasta que se alcance un nuevo equilibrio entre lo que se deposita por la aplicación de presión y lo que se arrastra por efecto de la velocidad de flujo cruzado, esto es lo que se denomina la teoría de flujo límite.

**Figura 5.8.** Evolución del flux en el tiempo en función de la PTM aplicada y una velocidad de 4 m/s.

(Los valores del flux deben dividirse por 10^5 a fin de obtener el valor real).

El efecto de la presión transmembrana se evaluó también para la viabilidad de los microorganismos, de acuerdo a esto, la mayor concentración se logró con una presión de 2 bar, tal como puede verse en la figura 5.9 y en la tabla 5.5.

Cabe destacar, que independiente de la diferencia de presión aplicada, el recuento de microorganismos en el permeado estuvo entre 0 y $\sim 10^2$ UFC/ml.

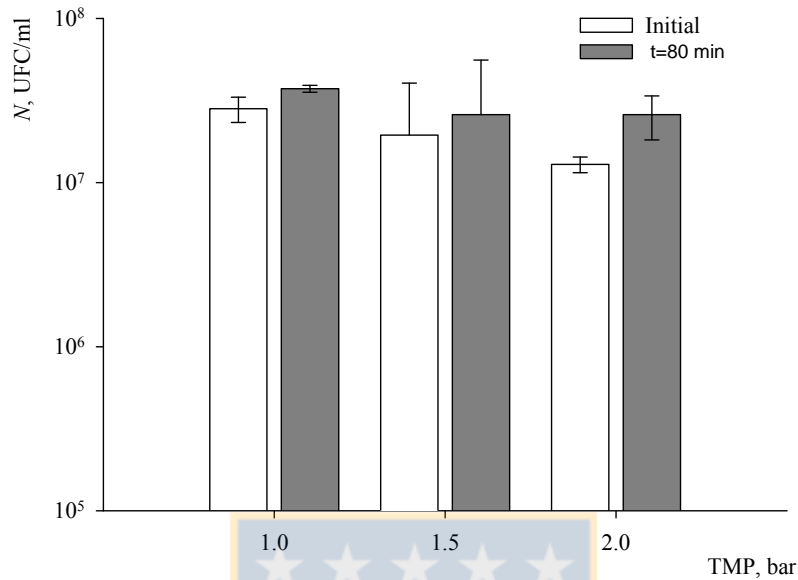


Figura 5.9. Concentración de microorganismos viables en la alimentación y en la corriente del concentrado después de 80 minutos de operación.

Tabla 5.5. Factor de concentración (F_c) en el recuento de microorganismos viables en función de PTM

	UFC/mL		
	1 bar	1.5 bar	2 bar
Inicial	$2.47 \cdot 10^7$	$3.42 \cdot 10^7$	$1.29 \cdot 10^7$
Concentrado	$3.60 \cdot 10^7$	$6.80 \cdot 10^7$	$3.19 \cdot 10^7$
F_c	1.5	2.0	2.5

A la luz de los resultados, se decidió por tanto seguir trabajando con una PTM de 2 bar.

5.2.2.2 Influencia de la velocidad tangencial, v

Una vez definidas las condiciones de presión bajo las cuales era posible obtener el mayor factor de concentración para la biomasa, se midió el efecto de la velocidad tangencial.

Tabla 5.6. Reducción de la densidad de flujo en función de la velocidad tangencial

v , m/s	3.0	4.0	5.0
$J_E, m^3/(m^2 s)$	$2.26 \cdot 10^{-5}$	$3.00 \cdot 10^{-5}$	$2.51 \cdot 10^{-5}$
FR , %	36.4	31.0	37.2

Al igual que ocurrió con la presión, fue posible alcanzar el estado estacionario alrededor de los 100 minutos desde el inicio de la operación. Con estos valores fue posible calcular los correspondientes factores de reducción que se muestran en la tabla 5.6. Si bien las diferencias entre uno y otro no son tan grandes, si son estadísticamente significativas, encontrándose que la mejor operación en términos de este parámetro es una velocidad de 4.0 m/s.

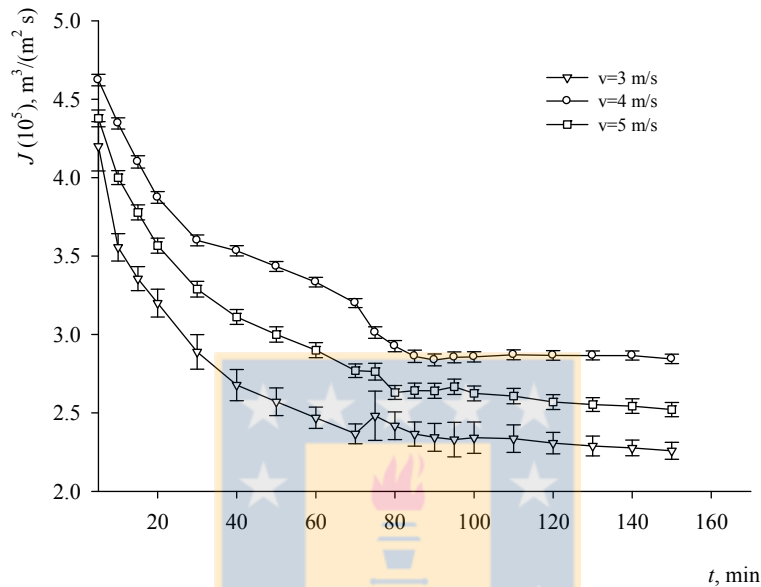


Figura 5.10. Evolución del flujo en el tiempo en función de la velocidad tangencial aplicada. PTM = 2 bar.
(Los valores del eje y en el gráfico deben dividirse por 10^5 a fin de obtener el valor real)

Si bien se tiene la idea que el aumento de velocidad tangencial siempre es positivo, a fin de arrastrar los correspondientes depósitos que pudieran formarse en la pared de la membrana. Sin embargo, a partir de la figura 5.10 queda claro que esto no es siempre así. De esta figura se desprende que es mejor operar la membrana a 4 m/s que a 5 m/s. Una de las explicaciones para esto radica en el efecto que tiene la velocidad tangencial sobre la orientación que toman las bacterias al interior de la membrana, especialmente cuando estas tienen forma de bacilo (rod – shaped), Tanaka *et al.* (1994, 1996) encontraron que en este caso, en la medida que mas grande es la velocidad, los microorganismos tienden a orientarse de forma paralela al flujo, luego, por efecto de la presión transmembrana se adhieren de esa misma forma a la pared de la membrana provocando con ello el taponamiento de los poros.

El efecto de la velocidad en la calidad de la separación se evaluó en los mismos términos que en el caso de la presión transmembrana, los resultados se presentan en la tabla 5.7

Tabla 5.7. Factor de concentración de biomasa (recuento de microorganismos viables) en función de la velocidad tangencial.

	UFC/mL		
	3 m/s	4 m/s	5 m/s
Inicial	$4.93 \cdot 10^7$	$1.29 \cdot 10^7$	$6.43 \cdot 10^7$
Concentrado	$6.10 \cdot 10^7$	$3.19 \cdot 10^7$	$1.13 \cdot 10^7$
F_c	1.2	2.5	1.8

De acuerdo esto, la mayor concentración de microorganismos se obtiene con una velocidad de 4 m/s y considerando esto es que se decidió seguir trabajando con este valor en el resto de los ensayos.

5.2.2.3 Efecto del pH

Para membranas del tipo Carbosep o Kerasep, el pH de la alimentación es muy importante a la hora de la separación dado que dependiendo del pH de esta, existirá más o menos flujo de permeado debido al comportamiento hidrofílico o hidrófobo de la membrana. Con esto en mente, se modificó el pH del caldo de cultivo, desde su valor original ($\sim 3.5 - 3.8$) hasta llevarlo a 7.0 mediante la adición de hidróxido de sodio. Los resultados se muestran en la figura 5.11.

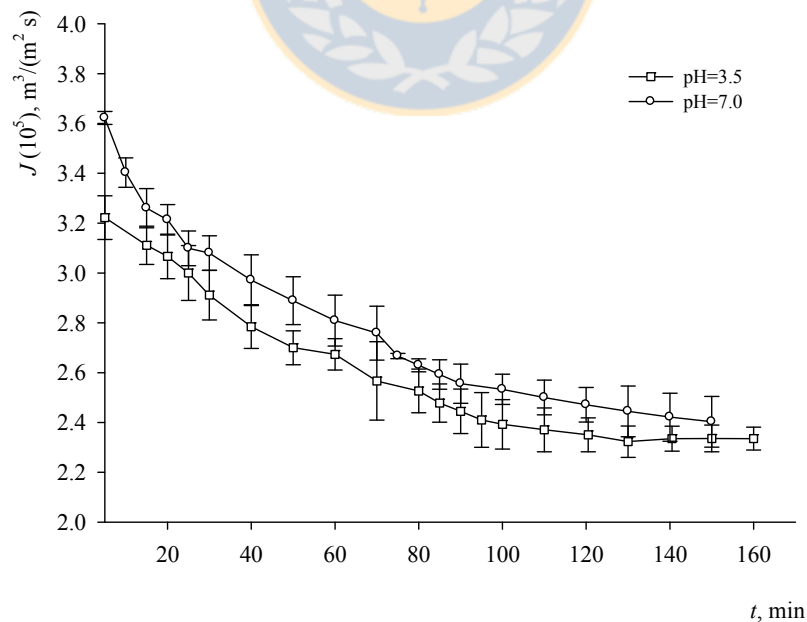


Figura 5.11. Evolución del flux en el tiempo en función del pH de la alimentación. PTM = 2 bar, $v = 4$ m/s.

(Los valores del eje y en el gráfico deben dividirse por 10^5 a fin de obtener el valor real)

En la figura se ve claramente que si bien en un principio existe un aumento del flux, en la medida que pasa el tiempo ambas curvas tienden a un valor en común, esto lleva a pensar, que en aras de no manipular en forma excesiva el caldo de fermentación, lo mejor sería filtrarlo en forma directa desde el matraz o reactor de cultivo. El factor de concentración para el recuento de microorganismos fue de 2.2 para pH=3.5 y 2.6 para un pH=7.0, el análisis estadístico reveló que la diferencia no era significativa.

Si bien se ha reportado, que la separación es de mejor calidad en la medida que el pH de la alimentación aumenta en este caso esto no se cumplió, probablemente por el hecho de estar trabajando con un medio diluido, ya que se cree que el pH pudiera tener efecto en las coagulación de las proteínas presentes, ahora bien, al estar trabajando con un medio bajo en proteínas dicho efecto no pudo ser apreciado.

Aún así, para evitar excesivas manipulaciones en el caldo de fermentación, se decidió no hacer variaciones de pH previo a la separación.

5.2.2.4 Efecto concentración de sólidos

El uso del medio tradicional de cultivo (MT) provocó por un lado un aumento en la cantidad de bacterias en la alimentación y por otro lado un aumento en la cantidad de sólidos disueltos. Frente a esto se produjo una diferencia notable en cuanto al desempeño de la membrana. De hecho el lavado de la misma tomó mucho más tiempo y cantidad de químicos a fin de recuperar el flux original. Sumado a esto, la eficiencia de la separación también se vio afectada, ya que al hacer el balance entre las bacterias que ingresan al sistema y las que salen del mismo hubo diferencias, las cuales se atribuyen al hecho de que las mismas pudieron haber quedado adheridas en forma permanente al queque formado en la membrana de microfiltración.

5.3 Secado y Estabilización de biomasa

5.3.1 Condiciones de operación

5.3.1.1 Acidez de la alimentación

El pH no demostró tener influencia notoria en el rendimiento o la humedad al finalizar la operación, alcanzando en todos los casos un promedio de 35% y 4.6% en rendimiento y humedad respectivamente. Con respecto a la viabilidad, el pH no tuvo tampoco ningún efecto en el recuento inmediatamente después del secado.

Por estas razones el pH se mantuvo constante en los experimentos siguientes, con lo cual se evitó la excesiva manipulación del medio, y por tanto el riesgo de contaminación en esta etapa.

5.3.1.2 Presión de atomización y temperatura

La presión de atomización (P) tiene un efecto directo en el diámetro y en la cohesión de las partículas, lo cual a su vez tiene un impacto directo en el desempeño de la operación y en la separación en el ciclón. Se encontró que P no tuvo influencia en la humedad del producto final (en promedio 4.6%), algo que no era lo que se esperaba dado que los resultados de Telang y Thorat (2010), mostraron que en la medida que se aumentaba la presión de atomización era posible obtener un producto con menor contenido de humedad.

Con respecto al rendimiento, la presión tuvo una influencia bastante importante. Cuando $P = 1$ bar, muchas de las gotas que se generaron fueron de gran tamaño, lo que causó que muchas de ellas no se secaran completamente en la cámara de secado y quedaran adheridas a las paredes de la misma provocando un rendimiento bastante bajo (4.4%). Por el otro lado, a $P = 3$ bar, se generaron, gotas demasiado pequeñas las cuales fueron fácilmente arrastradas por el aire húmedo que abandona el equipo (rendimiento de 18.9%). Los mejores resultados en este aspecto se consiguieron con $P = 2$ bar (26.3%).

La viabilidad de los microorganismos no se vio afectada por presiones de 2 ó 3 bar, sin embargo, el uso de 1 bar también tuvo un efecto negativo en el recuento bacteriano, tal como puede verse en la figura 5.31. Luego, tomando en cuenta el buen desempeño en términos de rendimiento y sobrevivencia de microorganismos (~95%), todos los ensayos restantes fueron efectuados a una presión de 2 bar. Resultados similares fueron obtenidos por Telang y Thorat (2010) y Menshutina (2010).

La temperatura de salida (T_{out}) del secador tuvo efecto principalmente en la humedad y en la viabilidad del producto final, pero no en el rendimiento (en promedio 43.8%).

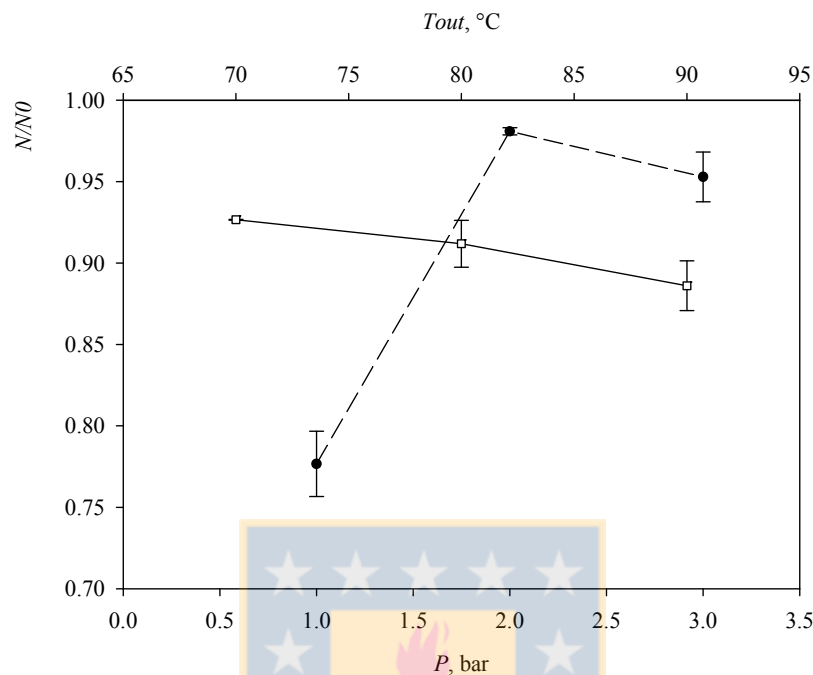


Figura 5.12. Efecto de la presión de atomización (●) y la temperatura de salida (□) en la supervivencia de *Lactobacillus plantarum* autóctono inmediatamente después del secado. N : Conteo bacteriano justo después del secado, N_0 : Conteo bacteriano antes del secado.

En la figura 5.12 es posible ver que existió una marcada pérdida de viabilidad del producto en la medida que la temperatura aumentó, este efecto ha sido ampliamente reportado (Varsha y Bhaskar, 2011; Silva *et al.* 2004; Meng *et al.* 2008; Chavez y Ledebor, 2007) y está relacionado con las drásticas perturbaciones causadas por la velocidad a la cuál el agua es removida desde las células lo que resulta en daño para componentes celulares de vital importancia como ADN y ARN (Varsha, 2011). Considerando que es importante mantener la viabilidad de los microorganismos por sobre 10^7 UFC/g, para que sean económicamente atractivos, este sería el valor mínimo aceptable al inicio del almacenamiento, bajo esta premisa, el uso de 70°C es lo más adecuado dado que aunque la humedad resulta más alta (5.3% versus 4.2% y 3.4%) cumple con los estándares (<10%). Temperaturas más bajas, sin bien son técnicamente posibles, no se recomiendan dado que la humedad del producto final aumenta por sobre el 12% lo cual impide asegurar una larga vida de estante al producto, especialmente a temperaturas por sobre los 15°C (Menshutina *et al.* 2010; Telang y Thorat, 2010).

5.3.1.3 Contenido de sólidos en la alimentación

El uso de un contenido de sólidos entre 20 ó 30 %p/p no hizo diferencias en cuanto al rendimiento obtenido (36.1% y 36.8% respectivamente) o la humedad (3.9% y 4.0% respectivamente). En contraste, el uso de 40% p/p ó 50% p/p resultó, en ambos casos, en un efecto negativo para ambos parámetros. La elección del 20% p/p fue hecho principalmente debido a que a esta concentración no se manifestaron mayores problemas de preparación de las soluciones, ni tampoco en el paso de la misma a través de la boquilla de atomización, lo cual si fue observado usando concentraciones mayores de sólidos. El resultado obtenido concuerda con lo obtenido por Yu *et al.* (2007), donde los mejores resultados fueron obtenidos usando esta misma concentración de sólidos en la microencapsulación mediante secado por atomización de fosfolípidos. En su estudio, soluciones más concentradas se relacionaron con altas viscosidades y dificultades en la atomización, lo que concuerda también con las observaciones ya mencionadas.

La influencia de la concentración de sólidos en el recuento de microorganismos al final del proceso, al igual que con el pH, no fue estadísticamente significativa.

Finalmente, a partir de los resultados de esta parte de la experimentación se decidió

1. Usar una concentración de sólidos de 20% p/p.
2. No alterar el pH se la solución resultante una vez que se han agregado los materiales de protección.
3. Operar el secador a una presión de atomización de 2 bar y manipular el flujo de alimentación a fin de lograr una temperatura de salida de 70°C.

Todos los experimentos que se detallan en los siguientes capítulos cumplen con estas tres características.

5.3.2 Efecto de la aplicación de estrés durante el cultivo³

5.3.2.1 Estrés térmico

La figura 5.13 muestra el efecto del secado por atomización de bacterias no estresadas osmóticamente pero cultivadas a diferentes temperaturas, 25°C que era la temperatura original de cultivo y 32°C que vendría a corresponder a la aplicación del estrés térmico. En ambos ensayos el conteo inicial de microorganismos antes del secado fue superior a 10^8 UFC/ml, tal como se ha recomendado en literatura (Morgan *et al.*2006).

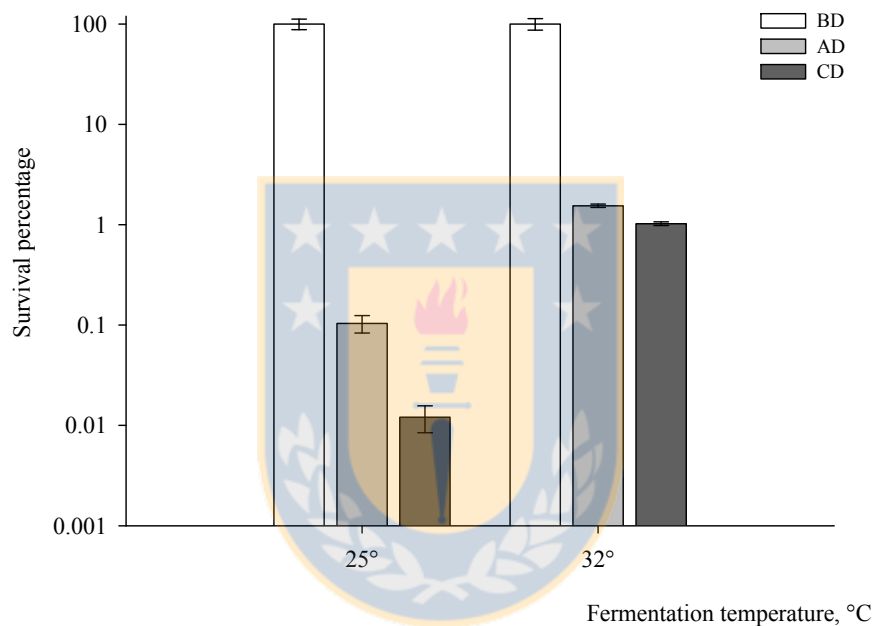


Figura 5.13. Efecto del estrés térmico durante el cultivo de *Lactobacillus plantarum* LPS 47. En ambos casos las bacterias fueron resuspendidas sólo en suero fisiológico previo a la operación de secado.

BD: Antes del secado, AD: Después del secado, CD: Daño en la membrana celular.

El uso de una temperatura más alta durante el cultivo pareciera brindar claramente una protección adicional frente al secado comparando con aquellas bacterias que fueron cultivadas a 25°C ya que para esta última se observó una pérdida de viabilidad de 3 ciclos logarítmicos versus 1.5 ciclos logarítmicos perdidos al usar una temperatura de cultivo de 32°C. La respuesta a esto está en que, como ya ha sido anteriormente reportado, el hecho de someter a los microorganismos a un estrés subletal previo a la operación de secado incrementaría su resistencia a una condición mucho más extrema de temperatura

³ Paola Bustos and Rodrigo Bórquez (2013). Influence of osmotic stress and encapsulating materials on the stability of autochthonous *Lactobacillus plantarum* after Spray drying, *Drying Technology*, 31(1), 57 – 66.

(van de Guchte *et al.* 2002) como ser el secado por atomización donde se verán expuestos a temperaturas varios grados más altas (70°C en este caso). De acuerdo a varios autores esta resistencia está relacionada con una respuesta adaptativa asociada con la sobre expresión de proteínas GroEL y Dnak (Silva *et al.* 2004), lo que concuerda con lo encontrado para otros microorganismos mesófilos con características probióticas como ser *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus rhamnosus*.

Las diferencias entre el uso de una temperatura y otra se hicieron aún más notorias al analizar el daño en la membrana celular, en la figura es posible ver que de aquellas bacterias cultivadas a 25°C sólo alrededor de un 0.01% fue capaz de crecer en las placas con sal, lo cual implica que las bacterias restantes presentaron daños o alteraciones en la membrana celular que impidieron por tanto su adecuado crecimiento. Con el uso de 32°C se minimizó este daño y se observó un porcentaje de supervivencia cercano al 1%, es decir dos órdenes de magnitud superior.

El crecimiento de los microorganismos en las placas con sal tiene asociado el hecho de que los mismos son sometidos a estrés osmótico, luego, en este caso el estrés térmico tendría un efecto cruzado proveyendo protección a *L. plantarum* autóctono no sólo frente a altas temperaturas sino también frente a la presencia de sal en el medio, siempre y cuando la misma esté por debajo de los límites de letalidad para el microorganismo en cuestión, lo cual en este caso es válido, ya que para esta especie se ha reportado crecimiento hasta concentraciones de sal en el medio de hasta 1.5 M, mientras que en las placas dicha concentración sólo llega a 0.68 M.

Una vez finalizada esta parte del trabajo se decidió seguir trabajando a una temperatura de 32°C en los siguientes experimentos.

5.3.2.2 Estrés osmótico

Después de la exposición de *Lactobacillus plantarum* a diferentes niveles de estrés osmótico durante el cultivo, se observó que, independiente del nivel de estrés salino utilizado, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el recuento de microorganismos justo al término del cultivo. Esto es consistente con lo descrito por Glaasker *et al.* (1998), quien encontró que sólo sobre un estrés osmótico de 0.8 M en el medio de cultivo se registraron alteraciones en el crecimiento de *L. plantarum* ATCC 14917. Por otro lado, de acuerdo a lo que señala Kets *et al.* (1996), el rango es aún más amplio, ya que se estableció 1.5 M como el límite máximo aceptable para el crecimiento en el caso de *L. plantarum* P743.

Las diferencias entre las distintas condiciones de crecimiento se hicieron visibles sólo después del secado, donde la pérdida de viabilidad fue siempre mayor en aquellas muestras que habían sido estresadas osmóticamente, esto fue más notorio en la medida que el nivel de estrés aplicado fue mayor. El comportamiento descrito llamó la atención dado que bajo similares condiciones, una cepa de *Lactobacillus acidophilus* mostró mayor resistencia durante el secado por atomización cuando un estrés de 0.25 M fue usado durante la etapa de cultivo (Riveros *et al.* 2009). En forma análoga, una cepa de *Lactobacillus plantarum* mostró buena resistencia al secado cuando se cultivó bajo una concentración de 1.0 M (Kets *et al.* 1996), aunque este último caso no es totalmente comparable dado que se usaron condiciones de secado mucho menos agresivas que las que usualmente implica el uso del secado por atomización.

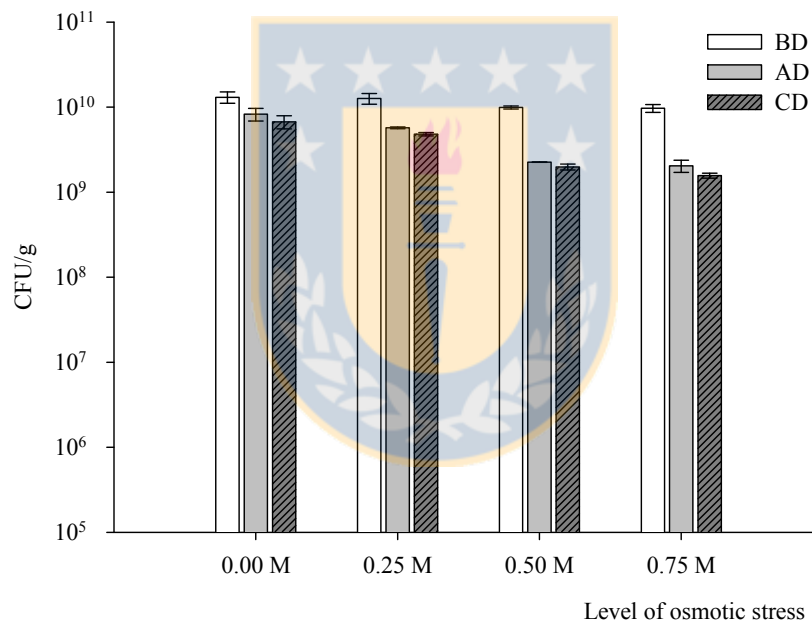


Figura 5.14. Efecto del estrés osmótico durante el cultivo de *Lactobacillus plantarum* LPS 47. El cultivo se llevó a cabo a 32°C y se usó lactosuero (20% p/p) como material de encapsulación. BD: Antes del secado, AD: Después del secado, CD: Daño en la membrana celular.

De acuerdo a Csonka (1989), las bacterias responden al estrés osmótico mediante la acumulación de solutos denominados compatibles ya que su exceso no afecta negativamente al microorganismo. La función de estos solutos es restablecer el balance osmótico, mediante el paso de agua a través de la membrana celular, de forma de evitar un shock hiper o hipo-osmótico. Dentro de los solutos

compatibles se incluyen: iones potasio, azúcares, polioles, amino ácidos y aminos cuaternarios. En el caso específico de bacterias ácido lácticas, la acumulación de uno o más de estos solutos dependerá de cada especie en particular (van de Guchte *et al.* 2002). En forma específica, para *L. plantarum* existen reportes que señalan que el mismo es incapaz de responder adecuadamente al estrés osmótico causado por la acumulación de iones sodio o potasio, lo cual tiene un efecto inmediato en los cambios de volumen de la célula y por tanto en la membrana celular, lo cual tiene un efecto negativo en los componentes macromoleculares del citoplasma (Kets *et al.* 1996). Adicionalmente, se han reportado alteraciones en la composición de ácidos grasos de la membrana, lo cual claramente afectará el transporte a través de ella (Oliveira *et al.* 2007 y Guillot *et al.* 2000).

En resumen, si durante el tiempo de exposición a NaCl, el componente celular más afectado de *L. plantarum* fue la membrana citoplasmática, y durante el secado por atomización es ésta misma también la zona más expuesta a deshidratación, es de esperar que la viabilidad durante el secado se verá más afectada en la medida que las bacterias se vean expuestas en mayor grado a altos niveles de salinidad durante el cultivo, lo cual es concordante con los resultados experimentales.

5.3.3 Centrifugación del caldo de fermentación

En los experimentos realizados hasta este punto, en todo momento se centrifugó el caldo de fermentación a fin de recuperar sólo la biomasa. La excesiva manipulación así como el hecho de que la etapa de centrifugación se convierte en un cuello de botella si lo que se desea es la elaboración de un producto de este tipo a gran escala y en lo posible de forma continua llevó a plantearse la eliminación de la etapa de centrifugación, lo cual permitía agregar en forma directa los materiales de protección al medio de cultivo y de ahí pasar directamente a la etapa de secado.

Tabla 5.8. Rendimiento y humedad de *L. plantarum* LPS 47 secado por atomización con (70°) y sin centrifugación (SC70°) del caldo de fermentación.

	Rendimiento, %	Humedad, %
70°	54.3 ± 1.5	5.38 ± 0.12
SC70°	42.4 ± 1.1	5.27 ± 0.21

La tabla 5.8 da cuenta que existen diferencias significativas en cuanto al rendimiento del producto, pero no así en la humedad. No se tiene una explicación clara para el comportamiento del rendimiento, pero existe la hipótesis de que exista una pequeña variación de viscosidad entre un caso (siendo más viscoso

aquel que no ha sido centrifugado), esto, como ya se ha visto, tendría una incidencia directa en el paso del líquido a través de la boquilla de atomización, modificando el tamaño y las características de las gotas, lo que a su vez podría provocar que el producto quedara en una mayor proporción adherido a las paredes de la cámara de secado, aún así, no es una diferencia significativa, y está dentro de los valores que se manejan para el común de las operaciones realizadas en ese equipo, por tanto no se considera que sea una variable de peso a la hora de tomar la decisión de centrifugar o no.

Una variable importante es la viabilidad de los microorganismos, en este sentido, a partir de la figura 5.15 se desprende que no hubo diferencias en la supervivencia después del secado por atomización entre las bacterias que fueron separadas del caldo de fermentación previo a la operación y aquellas que no lo fueron (SC70°) con un 13.5 y un 14.4 % respectivamente. Sí se observaron diferencias en cuanto al daño en la membrana celular (6.0 versus 7.5 %), sin embargo, de acuerdo al análisis estadístico, éstas no fueron significativas.

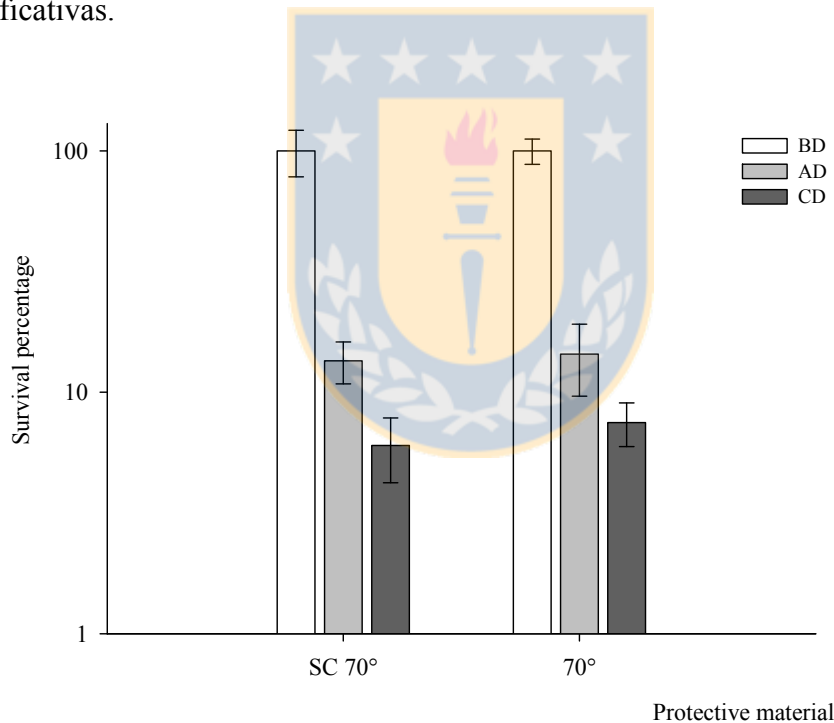


Figura 5.15. Efecto de la centrifugación del caldo de fermentación en la resistencia de *Lactobacillus plantarum* LPS 47 frente al secado por atomización. El cultivo se llevó a cabo a 32°C y se usó lactosuero (20% p/p) como material de encapsulación. BD: Antes del secado, AD: Después del secado, CD: Daño en la membrana celular.

Atendiendo a estos resultados no habría de momento ningún tipo de restricción en el caso que se deseara eliminar la etapa de centrifugación, lo cual reduciría notablemente los tiempos destinados a ella en el caso que se trabaje con grandes volúmenes, además, se evitaría una manipulación excesiva de los

microorganismos y por último se eliminaría el gasto energético (y por tanto económico) asociado a la operación.

5.3.4 Estudio del efecto de materiales encapsulantes en la viabilidad de *L. plantarum*

5.3.4.1 Comportamiento de *Lactobacillus plantarum* estresado osmóticamente durante el cultivo

La figura 5.16 muestra el efecto del secado por atomización en bacterias no estresadas osmóticamente. En todos los ensayos el conteo inicial de microorganismos antes del secado fue mayor a 10^8 CFU/ml, tal como se ha recomendado en literatura (Morgan *et al.* 2006).

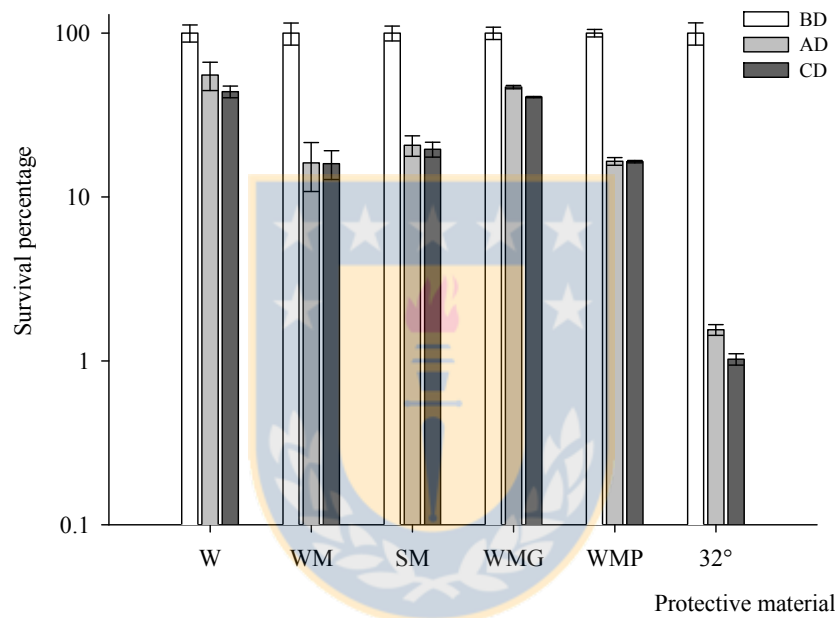


Figura 5.16 Porcentaje de supervivencia de *Lactobacillus plantarum* antes del secado (BD), inmediatamente después del secado (AD) y daño en la membrana celular (CD) en presencia de distintos materiales de protección. W=Lactosuero; WM=Lactosuero – Maltodextrina; SM=Leche descremada – Maltodextrina; WMG=Lactosuero – Maltodextrina – Goma arábica; WMP=Lactosuero – Maltodextrina – Pectina; 32°= Bacterias resuspendidas en suero fisiológico, sin protección.

De esta figura se desprende que es absolutamente necesario el uso de materiales de protección, esto porque en la muestra control (32°C), la cual sólo fue resuspendida en suero fisiológico, la viabilidad disminuyó alrededor de 1.8 ciclos logarítmicos, mientras que en las muestras que en las que se usó protección, la pérdida de viabilidad estuvo en el rango de 0.3 – 0.9 ciclos logarítmicos, usando lactosuero y la mezcla WMP respectivamente. En consecuencia, la incorporación de sustancias protectoras tiene claramente un efecto positivo, lo cual se debe principalmente a la estabilización de la

membrana celular y la costra externa generada por el encapsulante, especialmente cuando este contiene proteínas y/o azúcares (Li *et al.* 2006). Menshutina *et al.* (2010), agregan además que la adición de material de protección no sólo mejora la supervivencia de los microorganismos, si no también tiene un efecto en la fluidez del producto, lo que claramente se relaciona con la calidad de la atomización.

Contrario a los mejores resultados que reporta Desmond *et al.* (2002), en el secado por atomización de *L. paracasei* donde se usó una mezcla de leche descremada – goma arábica como material de protección, en este trabajo el uso de goma arábica como parte del medio de protección no mostró ningún impacto en los resultados después del secado, en comparación al comportamiento que mostraron otros agentes de protección. Aún así, la goma no fue excluida del análisis ya que como se ha mencionado, no siempre existe una buena correlación entre los resultados justo después del secado y durante la etapa de almacenamiento (Chávez y Ledebøer, 2007; Morgan *et al.* 2006).

Los resultados que dan cuenta del daño en la membrana celular (test de sensibilidad a placas con NaCl) muestran, que aunque hubo diferencias entre los distintos materiales de encapsulación, éstas no fueron significativas. La diferencia más notable se produjo entre las muestras microencapsuladas y aquellas que no lo estaban (32°C) lo cual resalta aún más la necesidad de contar con protección durante el secado.

Comparando estos resultados con los obtenidos por Gardiner *et al.* (2000) para *L. salivarius* y *L. paracasei*, quienes usaron leche descremada como agente de protección, los porcentajes de sensibilidad a NaCl (en placa) para este estudio no excedieron un 21%, mientras que Gardiner reporta entre 70% y 100% de sensibilidad. A pesar de esto, al igual que Gardiner, se observó que el tamaño de las colonias en las placas MRS – NaCl era claramente más pequeño que el que se observaba en las placas tradicionales de MRS.

El hecho que el daño en la membrana celular se haya visto minimizado mediante el uso de estas sustancias protectoras es un gran precedente, ya que esta parte de los microorganismos es la que regula en última instancia la adhesión y colonización del órgano o tejido huésped. Está claro que si la bacteria no logra colonizar no podrá ejercer su rol probiótico.

El análisis estadístico considerando tanto la viabilidad inmediatamente después del secado así como el daño a la membrana celular, señala que no existen diferencias estadísticamente significativas en el uso

como material de protección de suero (W) o de las mezclas suero-maltodextrina (WM) y leche-maltodextrina (SM). En segundo lugar queda el uso de goma arábica y pectina ($p=0,369$). La viabilidad de cada una de estas muestras bajo las condiciones antes descritas, queda detallada en la tabla 5.9.

Tabla 5.9. Resultados secado por atomización *Lactobacillus plantarum* autóctono. BD: Antes del secado, AD: Después del secado, CD: Evaluación daño membrana celular. Todos los valores en log UFC/g*.

	W	WM	SM	WMG	WMP	32°C
BD	10.11 ± 0.07 ^{A,a}	10.51 ± 0.05 ^{A,b}	10.45 ± 0.04 ^{A,b}	10.16 ± 0.02 ^{A,a}	10.48 ± 0.07 ^{A,b}	10.47 ± 0.06 ^{A,c}
AD	9.85 ± 0.15 ^{B,a}	9.72 ± 0.06 ^{B,a}	9.77 ± 0.01 ^{B,a}	9.83 ± 0.02 ^{B,a}	9.62 ± 0.03 ^{B,a}	9.66 ± 0.02 ^{B,a}
CD	9.75 ± 0.09 ^{B,a}	9.71 ± 0.08 ^{B,ab}	9.74 ± 0.02 ^{B,a}	9.77 ± 0.02 ^{B,a}	9.69 ± 0.06 ^{B,ab}	9.48 ± 0.03 ^{C,b}

*Diferentes letras mayúsculas es una misma columna muestran diferencias estadísticas entre los valores. Diferentes letras minúsculas en una misma fila muestran diferencias estadísticas entre los valores.

De igual forma como se hizo con las muestras que no habían sido sometidas a estrés osmótico, se estudió el efecto del material de encapsulación y también del nivel de estrés osmótico (durante el cultivo) en la estabilidad al almacenamiento de las muestras estresadas osmóticamente. Los resultados, al igual que en el caso anterior, sugieren como mejores alternativas el uso de lactosuero (W) o de las mezclas Leche descremada-Maltodextrina (SM) o Suero-Maltodextrina (WM), sin diferencias significativas entre ellos. En un segundo lugar quedan el uso de goma arábica o pectina (SMG y SMP), las cuales incluso mostraron una marcada pérdida de viabilidad en la medida que aumentó el nivel de estrés osmótico, de hecho, se alcanzó una pérdida de 1.5 ciclos logarítmicos. Sumado a todo esto, bajo un estrés de 0.75 M se observó también un ligero aumento en el daño celular, el cual se vio reflejado principalmente en presencia de goma arábica o pectina.

A la luz de estos resultados se hace importante señalar que, independiente del hecho que ciertos medios de protección se comportaron mejor que otros y que el uso de estrés osmótico mermó la resistencia de las bacterias al secado, el conteo de microorganismos viables inmediatamente después del secado estuvo en el rango $7.3 \cdot 10^9$ a $3.5 \cdot 10^8$ UFC/g. Tomando en cuenta que para fines probióticos la cantidad de bacterias viables debe estar entre 10^7 a 10^8 UFC/g (Toledo *et al.* 2010; Peighambardoust *et al.* 2011; Chavez y Ledebor, 2007) todos los medios de protección ensayados servirían para tal propósito, al menos inmediatamente después de efectuado el secado.

Tal como ha sido señalado por Li *et al.* (2008), el daño celular no sólo ocurre durante el proceso de secado sino también durante el almacenamiento de los productos deshidratados. A partir del seguimiento semanal realizado, se observó que en el transcurso de los días existió una disminución paulatina de la viabilidad de *L. plantarum* en el producto deshidratado. La magnitud de dicha disminución estuvo claramente influenciada por el material de protección más que por el nivel de estrés osmótico aplicado durante el cultivo.

En cuanto al material de protección, el análisis reveló que al cabo de los 70 días lactosuero (W) fue la sustancia que brindó los mejores resultados en términos de la estabilidad de la cepa (Tabla 5.10), alcanzando una viabilidad de 9.98 log UFC/g. En un grupo separado quedaron las mezclas de leche-maltodextrina y suero-maltodextrina, mientras que en un tercer y cuarta posición quedaron aquellas muestras que contenían pectina y goma arábica respectivamente. En estos últimos casos, la concentración de microorganismos viables disminuyó por debajo de 10^8 UFC/g al cabo de seis semanas de almacenamiento a 4°C.

Contrario a lo expuesto por Oliveira *et al.* (2007), en relación a las limitaciones de la microencapsulación como herramienta para la estabilización de bacterias probióticas, en el trabajo aquí expuesto, si bien existieron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos medios de protección, en todos los casos la viabilidad se mantuvo por sobre 10^7 UFC/g, lo cual ratifica las amplias aplicaciones de la operación de secado por atomización.

Tabla 5.10. Conteo microorganismos viables de *Lactobacillus plantarum* autóctono a los 70 días de almacenamiento a 4°C. Todos los valores en log UFC/g[▲].

	W	WM	SM	WMG	WMP	32°C
0.00 M	9.98 ± 0.04 ^{A,a}	8.76 ± 0.03 ^{A,d}	9.46 ± 0.00 ^{A,b}	8.88 ± 0.02 ^{A,c}	8.39 ± 0.03 ^{A,e}	6.80 ± 0.01 ^f
0.25 M	9.23 ± 0.04 ^{BC,a}	8.46 ± 0.03 ^{BC,c}	8.79 ± 0.03 ^{C,b}	8.18 ± 0.06 ^{B,d}	8.35 ± 0.02 ^{B,c}	-
0.50 M	9.17 ± 0.00 ^{C,a}	8.36 ± 0.05 ^{C,c}	9.01 ± 0.01 ^{B,b}	8.34 ± 0.05 ^{B,c}	8.36 ± 0.05 ^{B,c}	-
0.75 M	9.33 ± 0.01 ^{B,a}	8.57 ± 0.04 ^{B,b}	8.85 ± 0.04 ^{C,b}	7.64 ± 0.04 ^{C,c}	7.72 ± 0.16 ^{C,c}	-

[▲] Diferentes letras mayúsculas es una misma columna muestran diferencias estadísticas entre los valores. Diferentes letras minúsculas en una misma fila muestran diferencias estadísticas entre los valores.

Volviendo a los distintos agentes protectores (encapsulantes), la labor del mismo radica principalmente en recubrir a la bacteria durante el proceso de secado, evitando con ello que las altas temperaturas provoquen su muerte en forma inmediata. La forma en que el material de protección actúa está

relacionado principalmente con la forma en que es capaz de estabilizar la membrana celular en la medida que la ella va perdiendo las moléculas de agua durante el proceso de deshidratación (Guerzoni *et al.* 2001), pero también actúan como agentes anti-oxidantes y fomentadores de la hidrofobicidad durante la vida de estante (Li *et al.* 2006). Bajo estos conceptos, se ha encontrado que los disacáridos actúan de mejor forma que los polisacáridos, cualquiera sea su tipo, ya que estos últimos al ser de mayor tamaño tienden a tener dificultades para interactuar con la membrana celular, por tanto se espera que la protección brindada por ellos se vea también disminuida. En este trabajo, al usar maltodextrina, goma arábica o pectina (todos polisacáridos), el problema estérico se hizo más notorio en la medida que aumentó el estrés osmótico ya que también en estos casos la membrana venía con cierta sensibilidad aún antes de la operación de secado. El lactosuero, por su parte, está constituido en un gran porcentaje por lactosa, un disacárido, frente a esto, existe gran información sobre la habilidad de protección que han mostrado los mismos especialmente en procesos de liofilización (e.g. Teixeira *et al.* 1995a). Una vez que las moléculas de agua son removidas, los disacáridos son capaces de formar enlaces del tipo puente hidrógeno con las proteínas que conforman la membrana celular, lo cual ayudaría a prevenir la desnaturalización de las mismas y con ello la ruptura total de la membrana (Li *et al.* 2008; Teixeira *et al.* 1995; Crowe *et al.* 1987). En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo corroboran los estudios ya realizados, ya que aquellas muestras en las cuales se usó lactosuero como material de protección mostraron una supervivencia del 90% aún después de 10 semanas de almacenamiento. El uso de lactosuero en vez de lactosa pura tiene como ventaja, además de las ambientales y económicas, el hecho de que el lactosuero además de contener lactosa, contiene lípidos y proteínas, los cuales son capaces de brindar una protección adicional a las bacterias (Martos *et al.* 2007).

Cabe destacar que todavía podrían hacerse mejoras en cuanto al almacenamiento del producto, por un lado agregando otras sustancias, y además utilizando otro tipo de envase, esto porque se ha mencionado en muchas publicaciones la importancia de las condiciones ambientales en términos de humedad relativa, temperatura y presencia (Wang *et al.* 2010) y la necesidad de contar con un empaque adecuado que sea capaz de impedir el paso de luz, humedad y oxígeno (Chavez y Ledebor, 2007). Los siguientes apartados tratan la primera de estas mejoras, estudiando la presencia de: mayor concentración de proteínas, otros carbohidratos, glutamato monosódico y sorbitol.

Para finalizar este apartado, la gran conclusión que se desprende del mismo es que el estrés osmótico durante el cultivo no tuvo mayor incidencia en la resistencia exhibida por la bacteria durante el secado

por atomización, de ahí que los siguientes experimentos se realizaron cultivando la cepa en el medio tradicional (MT). Ahora bien, con respecto al tema del estrés, el hecho que se elimine el estrés salino no implica que las bacterias no se encuentren estresadas en lo absoluto, cabe recordar que para llevar a cabo la cosecha de células se ha asegurado (de acuerdo al tiempo) que las mismas se encontraban en la fase estacionaria de crecimiento. Ahora bien, en este punto empieza a existir competencia por sustrato o carencia del mismo, además dependiendo de los metabolitos producidos podrá existir inhibición por la presencia de los mismos (ácido láctico en este caso) y finalmente los cultivos se han hecho sin control de pH por lo que los microorganismos han estado también expuestos a estrés ácido. Todas estas condiciones, por si solas incluso, han mostrado en otros trabajos que son capaces de crear en las bacterias una resistencia adicional al secado en comparación con aquellas, que han sido cosechadas en la fase exponencial de crecimiento o que incluso hayan sido potenciadas mediante el uso de algún tipo de estrés no letal en forma previa al secado (Li *et al.* 2008; Kim *et al.* 2001; Guerzoni *et al.* 2001), de hecho, tal como señalan van de Guchte *et al.* (2002) las bacterias en fase estacionaria desarrollan un estado general de resistencia al estrés.

A partir de los resultados obtenidos durante el desarrollo de todos estos experimentos, se decidió no usar estrés osmótico en el medio de cultivo, esto, porque quedó demostrado que no era capaz de conferir ningún tipo de protección adicional a la bacteria frente al secado y/o durante el almacenamiento, incluso, dependiendo del material de encapsulación, se observó un aumento del daño en la membrana celular en comparación a aquellas bacterias que no se habían visto sometidas a estrés. En cuanto al material de protección, lactosuero (20% p/p) mostró el mejor comportamiento, lo que fue más notorio durante el almacenamiento.

Los siguientes experimentos muestran la inclusión de otras sustancias a fin de mejorar aún más los resultados obtenidos en esta etapa inicial, en ellos se hace especial hincapié en la estabilidad a temperatura ambiente, esto a fin de reducir los costos asociados a la refrigeración y al hecho de mantener una cadena de frío durante el transporte.

5.3.4.2 Efecto de la inclusión de mayor porcentaje de proteínas en el medio protector⁴.

De acuerdo a Wang y Langrish (2010), quién trabajó en primera instancia con lactosa pura como material de protección, la inclusión de pequeñas cantidades de proteínas (entre 0.5 – 10% de los sólidos totales) tenía la capacidad de mejorar las características de las microcápsulas principalmente a nivel de superficies. Basados en esto, se decidió cambiar el lactosuero por concentrado proteico de lactosuero, lo cual corresponde a un cambio en la concentración de proteínas desde un 13% a un 32% en base seca aproximadamente.

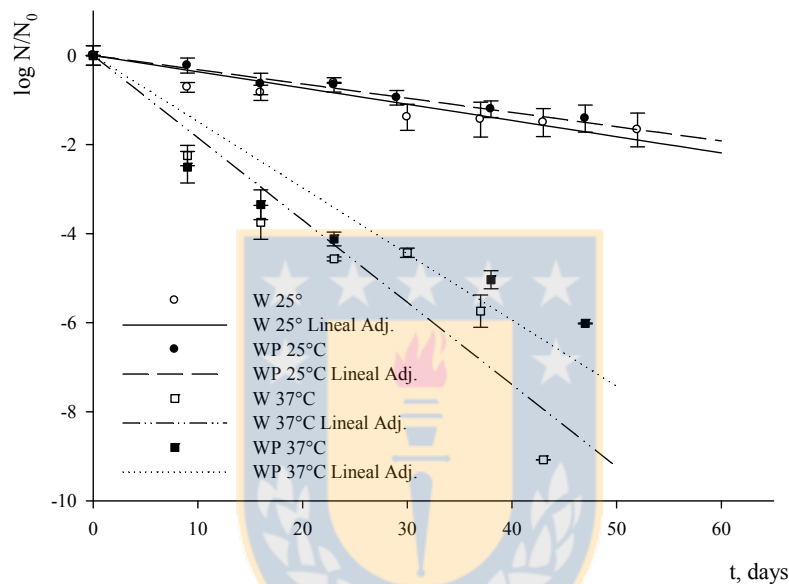


Figura 5.17 . Cinéticas de inactivación durante el almacenamiento de *Lactobacillus plantarum* encapsulado en lactosuero (W) y Proteína de suero (WP) a 25°C (○, ●) y 37°C (□, ■).

Los resultados mostraron un aumento en el rendimiento junto con el uso de proteína de suero, pasando de 54.3 ± 2.3 % (con lactosuero) a un 63.8 ± 3.6 % usando el concentrado proteico. La humedad no tuvo cambios significativos con el uso de una u otra sustancia, llegando a un valor promedio de 4.9 ± 0.3 %. El cambio en el rendimiento fue algo también observado por Wang (2010), quien postula que por las diferencias en las superficies de las microcápsulas, anteriormente mencionadas, la presencia de mayor concentración de proteína haría disminuir la adhesión por contacto entre dos partículas, o entre partículas y superficie. Esto último explicaría el porqué se recuperó mayor cantidad de producto seco en este caso.

⁴ Paola Bustos and Rodrigo Bórquez (En preparación, *Drying Technology*) Microencapsulation of a probiotic strain using milk solids, carbohydrates, monosodium glutamate and sorbitol in order to improve resistance to spray drying and storage at ambient temperature in uncontrolled atmosphere.

Con respecto a la estabilidad durante el almacenamiento, la figura 5.3.6, muestra claramente el efecto de la temperatura ambiental en esta variable, existiendo, como es de esperar, una mayor inactivación a 37°C. En cuanto al uso de una u otra sustancia queda claro, especialmente a una temperatura mayor, que la proteína de suero brindó una mayor protección, esto es explicado por Wang (2010) también desde el punto de vista de la superficie, esto, porque a través de fotografías SEM logró observar que en los casos en los que se usó sólo lactosa, las microcápsulas si bien se veían más uniformes tenían gran cantidad de grietas y la superficie en si mostraba un aspecto más bien rígido. Contrario a esto, en presencia de proteína de suero (y también en presencia de caseína) las microcápsulas resultaron ser más bien deformes, pero no se observaron grietas, esto hace pensar que las proteínas incrementarían la elasticidad de la película protectora formada durante el secado, previniendo con ello la formación de grietas durante la salida del vapor de agua. Al no existir las grietas se provee de mayor protección a las bacterias al interior de las microcápsulas.

La figura 5.18 corrobora las observaciones de Wang (2010), puesto que en la misma se muestra como varía la apariencia de las microcápsulas dependiendo si se usa lactosuero o concentrado proteico. En ella, es notorio que en (A) el agrietamiento es mucho más severo que lo exhibido por (B). Además, queda de manifiesto que el uso de lactosuero estuvo asociado a una mayor adhesión entre las partículas, de hecho, en algunas zonas, se ven verdaderos conglomerados de las mismas. Algo que no se observa en la figura 5.18B.

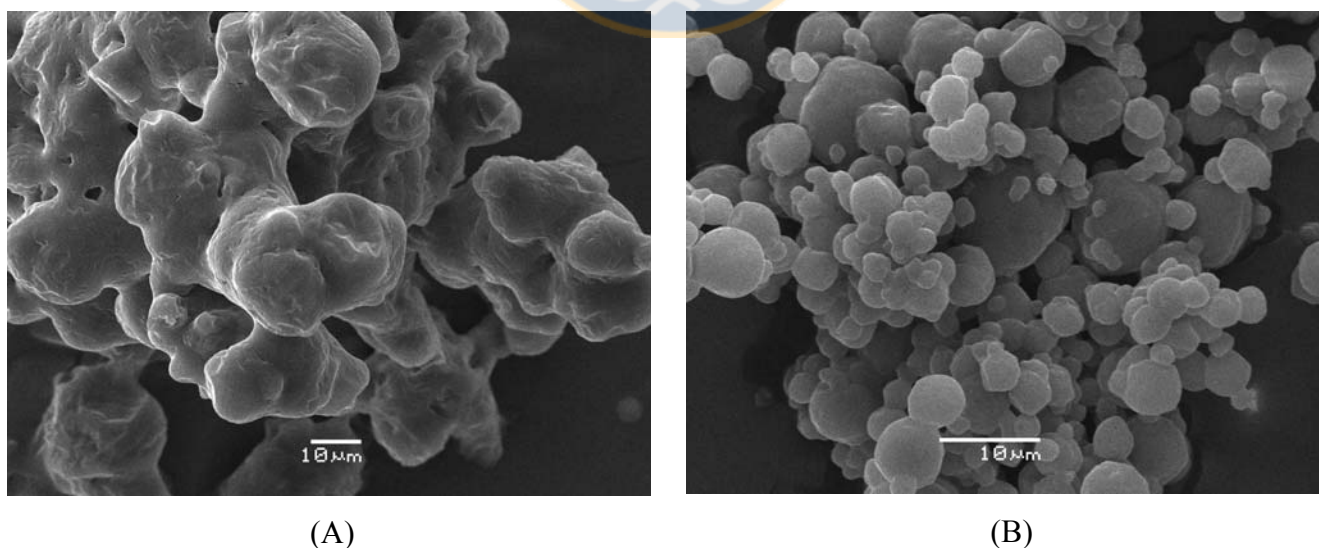


Figura 5.18. Fotografías SEM de *Lactobacillus plantarum* LPS 47 secado por atomización en presencia de Lactosuero (A) y Proteína de suero (B), ambas en concentración 20% p/p.

Luego, después de todo lo anteriormente expuesto y del respaldo bibliográfico, resultó oportuno cambiar el lactosuero por el concentrado proteico, manteniendo la concentración de protección, esto es 20% p/p.

5.3.4.3 Presencia de azúcares en el medio de protección.

Tal como ya se ha mencionado, los carbohidratos son ampliamente utilizados como agentes de protección en las operaciones de secado, sean estas por liofilización, al vacío secado por atomización, entre otras.

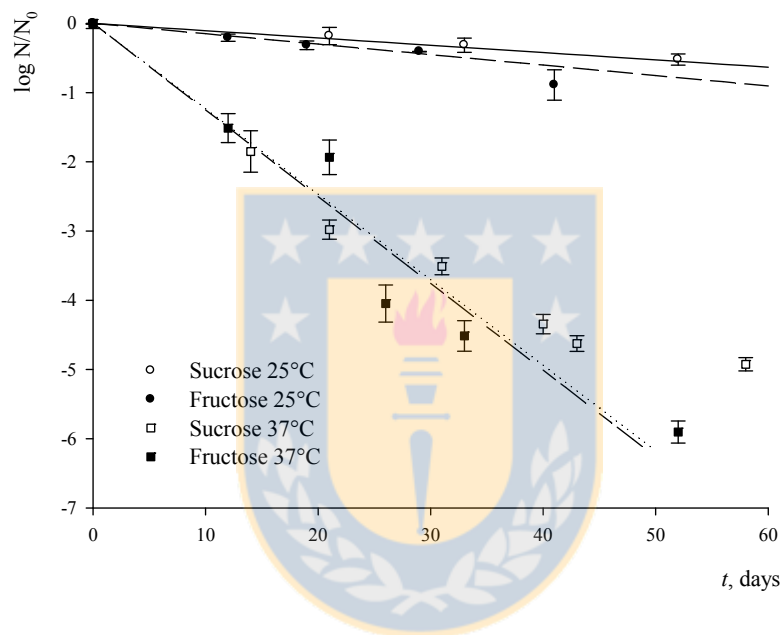


Figura 5.19. Cinéticas de inactivación durante el almacenamiento de *Lactobacillus plantarum* encapsulado en Proteína de suero – Fructosa (WPF) y Proteína de suero – Sacarosa (WPS) a 25°C (○, ●) y 37°C (□, ■).

El comportamiento que exhibe la figura 5.19 es muy similar al que se observó para el concentrado proteico por si solo, esto es, una pérdida gradual de viabilidad que se hace más notoria a altas temperaturas, no obstante, es interesante destacar que los cambios observados fueron relativamente más suaves que los que se muestran en la figura 5.17 para proteína de suero. Esto nos hace pensar que efectivamente existe un aporte a la estabilidad durante el almacenamiento, la cual estaría dada por la presencia de los carbohidratos.

La respuesta al porqué la presencia de carbohidratos, especialmente los disacáridos, pareciera ser de tanta ayuda cuando existen procesos de deshidratación, radica en que:

1. Son capaces de preservar la estructura y la funcionalidad de las proteínas durante el secado, formando puentes hidrógeno con las mismas en la medida que el agua va siendo removida, previniendo de esta forma la desnaturalización (Leslie *et al.* 1995)
2. En la membrana celular ejercen una labor similar, evitando las interacciones de tipo van der Waals que se generan en la medida que el agua es evaporada. Si el disacárido no está presente, es muy probable que las fuerzas de van der Waals provoquen que la membrana celular pase desde un estado de líquido cristalino a un estado gel. El problema de esto, es que una vez que se rehidratan las células (bacterias), la membrana volverá a sufrir un cambio de fase y lo más probable es que se generen grietas y defectos que no permitan, por ejemplo, una adecuada adhesión del microorganismo en el huésped. (Crowe, 1987; Leslie, 1995). Luego, los disacáridos son capaces, en la medida que forman estos puentes hidrógeno de disminuir la temperatura de transición de la membrana, T_m , y por tanto mantener la capa fosfolípídica en su estado líquido cristalino a temperatura ambiente aún cuando se ha producido la deshidratación (Meng *et al.*, 2008).

En cuanto al tipo de carbohidrato, claramente existen diferencias entre mono y disacáridos y entre estos últimos y los polisacáridos. Todo depende de la conformación (orientación química) y de la temperatura de transición vítrea, T_g , que posean. En este sentido, se busca que esta temperatura se mantenga lo más alta posible a fin de evitar que se pierda la estructura cristalina que genera el carbohidrato en la microcápsula ya que es la barrera protectora que protegerá al microorganismo del ambiente. Si una sustancia no tiene una buena T_g , es posible mezclar esta sustancia con otra que si lo tenga y lograr un valor más alto con la mezcla final. Incluso, al agregar otro tipo de sustancias diferentes de azúcares es posible lograr mejoras en la temperatura de transición. Cabe agregar que, de acuerdo a Mrad *et al.* (2012) un producto sólo puede ser estable cuando se almacena por debajo de la temperatura de transición vítrea, sólo así es posible asegurar una reducción en el riesgo de deterioro causado por la exposición del material de interés al ambiente. En este sentido, era de esperar que la mezcla que contenía sacarosa ($T_g=31^\circ\text{C}$) tuviera mejores resultados que aquella que contenía fructosa ($T_g=5^\circ\text{C}$), si se observa con cuidado la figura 5.19 efectivamente la mezcla con sacarosa se comporta mejor. Ahora bien, dado que la mayor parte del material de protección está conformado por proteína de suero, las diferencias entre ambas no son tan evidentes, aún así, el análisis estadístico revela que la

mezcla protectora que contiene sacarosa brinda una mayor protección a *L. plantarum* almacenado tanto a 25 como a 37°C.

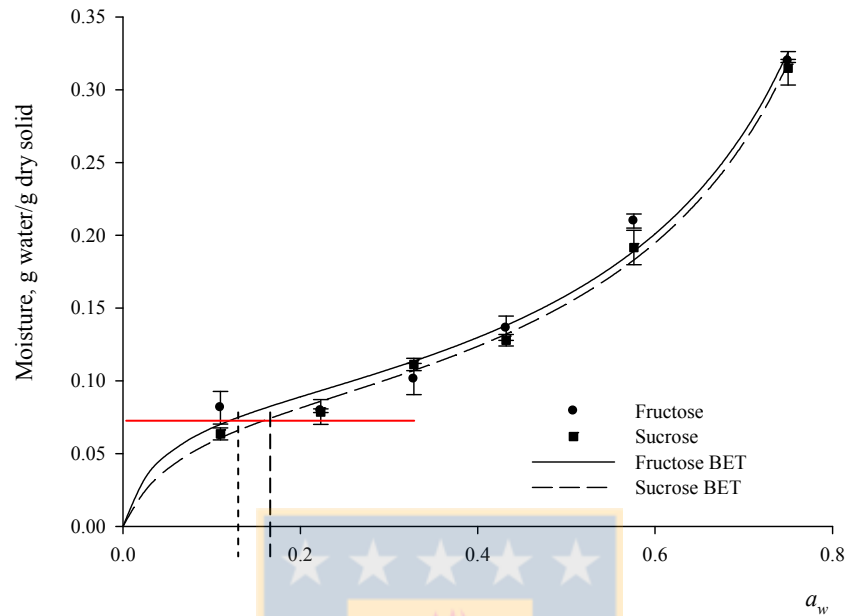


Figura 5.20. Isotherma de adsorción de *L. plantarum* encapsulado en WPF (●) y WPS (■) a 25°C.

La figura 5.20 muestra las isotermas de adsorción a 25°C para mezclas con fructosa y sacarosa obtenidas después del ajuste del modelo BET. De acuerdo a esto, ambas exhibieron un comportamiento tipo II (Forma sigmoideo), que se encuentra generalmente en alimentos. Las constantes se exponen en la tabla 5.11. Tal como se ve el ajuste fue bueno en ambos casos con r^2 promedio de 0.990.

Tabla 5.11. Parámetros del modelo BET ajustado a los datos experimentales para producto probiótico en base a LPS 47 almacenado a 25°C en presencia de WPGF y WPGS.

	B	$X_m, \text{g}_{\text{agua}}/\text{g}_{\text{sól.seco}}$	r^2	SE
WPF	25.223	0.0825	0.989	0.017
WPS	16.265	0.0811	0.998	0.007

De acuerdo a la teoría de adsorción, en la medida que el contenido de agua sobrepasa el valor de la monocapa (X_m), el producto es susceptible de sufrir deterioro. En este caso, para ambos azúcares dicha condición se cumple para actividades de agua, a_w , superiores a 0.15. Por tanto, a humedades relativas por sobre este valor, existirá agua que pueda ser utilizada para reacciones de degradación.

5.3.4.4 Presencia de glutamato monosódico en el medio de protección.

Los resultados obtenidos producto de la adición de glutamato monosódico y su efecto en el almacenamiento se muestran en la figura 5.21.

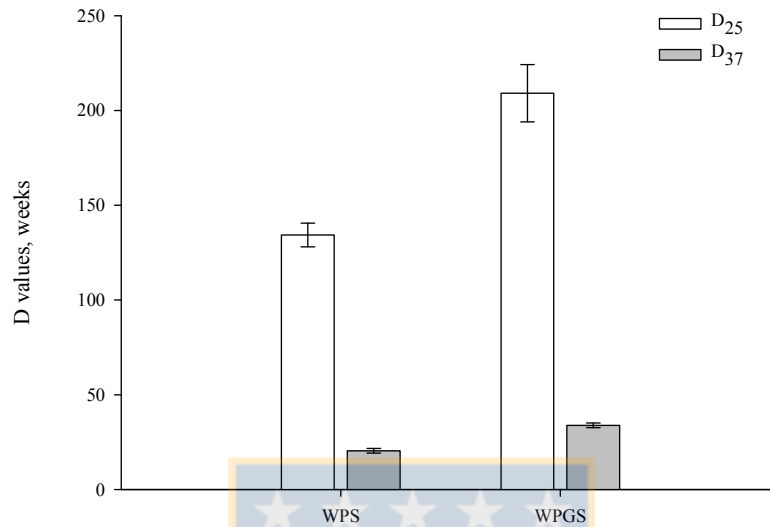


Figura 5.21. Estabilidad al almacenamiento de *Lactobacillus plantarum* LPS 47 secado por atomización en presencia de Proteína de Suero – Sacarosa (WPS) y Proteína de Suero – Sacarosa – Glutamato (WPGS)

De la figura se desprende que la adición de glutamato tiene un efecto bastante importante, ahora bien, no debemos confundirnos, ya que la verdadera vida útil queda determinada por la concentración de microorganismos viables que, como ya se ha mencionado, debe ser mayor a 10^7 UFC/g. La tabla 5.12 muestra estos resultados.

Tabla 5.12. Tiempo de vida de estante ($N=10^7$ UFC/g) para *L. plantarum* secado por atomización en presencia de WPS y WPGS a distintas temperaturas de almacenamiento. Valores dados en semanas.

	4°C () [*]	25°C () [♦]	37°C () [▲]
WPS	> 50 (8.90 ± 0.40)	18 (2.20 ± 0.06)	3 (2.77 ± 0.49)
WPGS	> 50 (8.73 ± 0.13)	24 (4.01 ± 0.21)	5 (3.96 ± 0.16)

La forma es que el glutamato monosódico es capaz de brindar protección no está aún clara, la única aproximación con la que se cuenta es la de Martos *et al.* (2007) quienes señalan que el modo de acción

^{*} Viabilidad de *L. plantarum* en log (UFC/g) al día 300.

[♦] Viabilidad de *L. plantarum* en log (UFC/g) al día 300.

[▲] Viabilidad de *L. plantarum* en log (UFC/g) al día 70.

de esta sustancia estaría asociado a la capacidad que tendría de interactuar con la bicapa lipídica de la membrana celular mediante su inserción en la región interfacial, esto a su vez incrementaría la fluidez de la membrana y por tanto mejoraría la tolerancia del microorganismo a la deshidratación (Silva *et al.* 2011). Sunny-Roberts y Knorr (2007) le confieren propiedades antioxidantes al glutamato, pero señalan también la necesidad de usarlo en conjunto con trehalosa. Ahora bien, cuando el glutamato fue agregado al medio de cultivo, de igual forma fue capaz de proteger a la bacteria en estudio (*Lactobacillus sakei*), pero en este caso, se encontró un aumento en la concentración de glutamato intracelular, por tanto durante el proceso de deshidratación el glutamato intracelular actúa como soluto compatible, regulando por tanto el transporte del agua a través de la membrana celular. (Ferreira *et al.* 2005).

En nuestro caso, no se cuenta con evidencia suficiente para conjeturar la vía en la que el glutamato fue capaz de proteger a *L. plantarum* LPS47, pero los resultados hablan por si solos, ya que de lo que se ha reportado, se habla de un periodo máximo de almacenamiento de 6 semanas a 25°C y de 4 semanas a 37°C para *L. rhamnosus* (Sunny-Roberts y Knorr, 2009). Mientras que para *L. kefir* CIDCA 8348 se mencionan 4 semanas a 30°C y 8 semanas a 25°C (Golowcycz *et al.* 2010). Incluso, en ambos trabajos las condiciones de humedad relativa ambiental han sido controladas y mantenidas en un 11%. Durante el desarrollo de estos experimentos, el único factor que se controló fue el de la temperatura ya que las muestras fueron mantenidas a humedad ambiental (~20% en verano hasta >90% en invierno).

Es también importante hacer notar que de acuerdo a Carvalho *et al.* (2003) la protección brindada por el glutamato sería especie – dependiente y que además su uso en conjunto con leche podría afectar de alguna forma sus efectos beneficiosos, esto último da lugar a dudas considerando que aquí se ha usado en conjunto con una importante porción de proteína de suero (derivado de la leche), obteniendo resultados más que satisfactorios.

5.3.4.5 Presencia de sorbitol en el medio de protección.

Como forma de completar el medio protector se evaluó el uso de sorbitol dados los antecedentes de protección mencionados en el ítem 3.4.2.2. Los resultados se presentan en la figura 5.3.11 y contrario a lo que se esperaba, fue posible mejorar aún más los resultados que se habían obtenido anteriormente.

La inclusión de sorbitol a una concentración de 12.5 g/L generó un aumento considerable en relación al tiempo durante el cual el producto deshidratado contaba con microorganismos vivos. La tabla 5.9 muestra cuantitativamente las mejoras en términos de estabilidad producto de la adición de sorbitol.

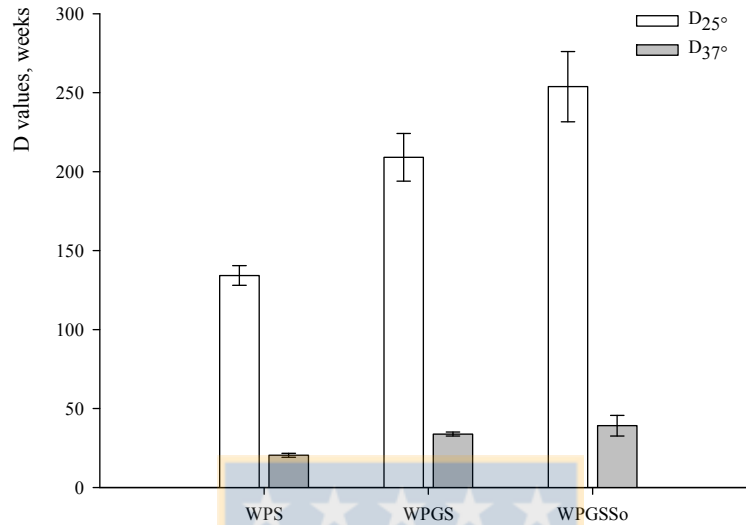


Figura 5.22. Estabilidad al almacenamiento de *Lactobacillus plantarum* LPS 47 secado por atomización en presencia de Proteína de Suero – Sacarosa (WPS) y Proteína de Suero – Sacarosa – Glutamato (WPGS) y Proteína de Suero – Sacarosa – Glutamato – Sorbitol (WPGSSo)

Estamos hablando que si tenemos los recursos suficientes podemos mantener una viabilidad del orden $\sim 10^9$ UFC/g por mucho más de un año, si mantenemos el producto refrigerado a 4°C. Ahora bien, si las condiciones no son tales, y se debe mantener el producto a temperatura ambiente el producto al cabo de 30 semanas, es decir, poco más de 7 meses todavía contaría con una viabilidad adecuada para ser comercializado.

Tabla 5.13. Tiempo de vida de estante ($N=10^7$ UFC/g) para *L. plantarum* secado por atomización en presencia de WPGSSo, comparación con WPGS a distintas temperaturas de almacenamiento. Valores dados en semanas.

	4°C () [*]	25°C () [♦]	37°C () [▲]
WPGS	> 50 (8.73 ± 0.13)	24 (4.01 ± 0.21)	5 (3.96 ± 0.16)
WPGSSo	> 50 (9.20 ± 0.10)	30 (5.27 ± 0.21)	7 (4.80 ± 0.04)

^{*} Viabilidad de *L. plantarum* en log (UFC/g) al día 300.

[♦] Viabilidad de *L. plantarum* en log (UFC/g) al día 300.

[▲] Viabilidad de *L. plantarum* en log (UFC/g) al día 70.

La forma en la que el sorbitol actúa como protección está un poco más clara que la del glutamato, en este sentido, Carvalho *et al.* (2003) señalan 3 formas en las que este compuesto trabajaría: (i) mantención de la turgencia, (ii) estabilización de las proteínas (formando complejos sorbitol – proteína) y lípidos presentes en la membrana celular y (iii) prevención del daño por oxidación debido a que es capaz de eliminar los radicales libres.

5.3.5 Pruebas de estabilidad de *Lactobacillus plantarum* post – secado

Una vez que se determinó la composición del material protector y se verificó que era capaz de mantener la viabilidad de la cepa autóctona, bajo condiciones ambientales de humedad y temperatura, por un periodo aceptable, se procedió a caracterizar el producto en función de sus propiedades físicas como de interés probiótico. Los resultados se presentan en las siguientes páginas.

5.3.5.1 Características físicas del producto deshidratado

Isoterma de adsorción

Se construyó la isoterma de adsorción para el producto deshidratado, tal como era de esperar, al tratarse de un proceso exotérmico, al aumentar la temperatura disminuyó la cantidad de agua adsorbida por el polvo. Los parámetros de ajuste del modelo BET se presentan en la tabla 5.14

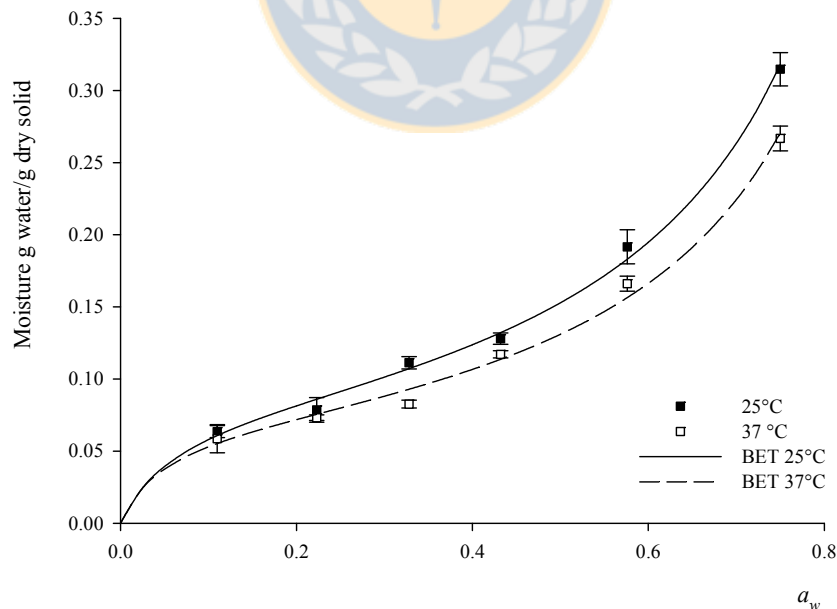


Figura 5.23. Isoterma de adsorción de *L. plantarum* encapsulado en WPGSSo a 25°C (■) y 37°C (□).

A partir de los datos también fue posible estimar la superficie específica del sólido, la cual resultó ser de 313 m²/g.

Tabla 5.14. Parámetros del modelo BET ajustado a los datos experimentales para producto probiótico deshidratado de LPS 47 y encapsulado en WPGSSo. Almacenamiento a 25° y 37°C.

	<i>B</i>	<i>X_m</i> , g _{agua} /g _{sól.seco}	R ²	SE
WPGSSo (25°C)	16.265	0.0811	0.998	0.007
WPGSSo (37°C)	20.491	0.0686	0.996	0.009

Mojabilidad

Se midió el ángulo de contacto del producto deshidratado tanto en hexano como en agua bidestilada (KSV, Sigma 700). Los resultados mostraron un ángulo $\theta = 89.5 \pm 0.4^\circ$, lo cual habla de que se trata de una superficie más bien hidrófoba, lo cual es positivo considerando que se desea mantener el producto lo menos propenso a la captación de humedad, esto considerando que se está almacenando bajo condiciones en las cuales no se hará control de la misma.

Morfología de microcápsulas

La figura 5.24 muestra la forma y la morfología de las partículas obtenidas a partir del proceso de estabilización.

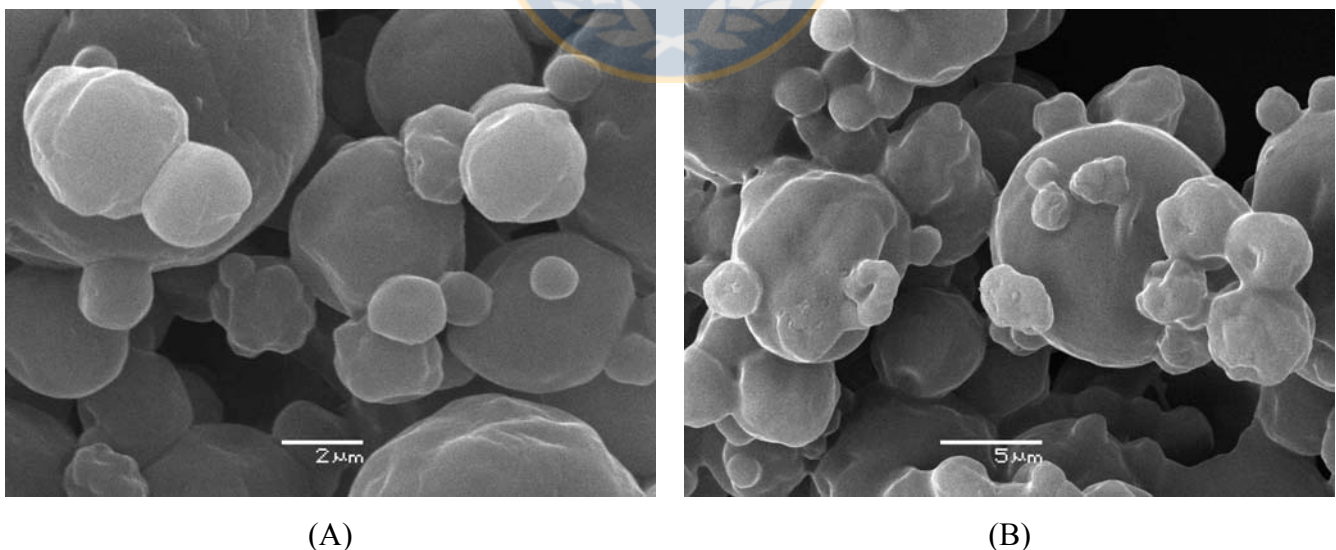


Figura 5.24. Fotografías SEM de *Lactobacillus plantarum* LPS 47 secado por atomización a una temperatura de salida de 70°C y en presencia de material encapsulante WPGSSo.

Las partículas se mostraron relativamente esféricas y no uniformes en tamaños. La superficie de las partículas se mostró más bien lisa y no se observaron grietas ni resquebrajamiento que dieran luces de algún tipo de anomalía. Es importante señalar que durante el barrido no se observó en ningún plano la existencia de alguna bacteria fuera de las microcápsulas, lo que corrobora la eficiencia lograda en el proceso. En relación a esto Yu *et al.* (2007) señalan que la concentración de sólidos afecta en gran medida la eficiencia de la encapsulación y determinaron que la misma se incrementa hasta llegar a un máxima concentración de sólidos de 20% p/p, luego de lo cual la eficiencia comienza a disminuir por el exceso de material. Junto con esto último, el exceso de sólidos estará también asociado a un aumento en la viscosidad, lo cual, como ya se vio en la primera parte, trae serios problemas en la atomización.

Distribución de tamaño de partículas

La figura 5.25 muestra la distribución de tamaños de las partículas que conforman el producto en polvo, tal como puede observarse, si bien existe un rango de tamaños, un 82% del volumen ocupado corresponde a partículas con un tamaño de entre 11 – 19 μm .

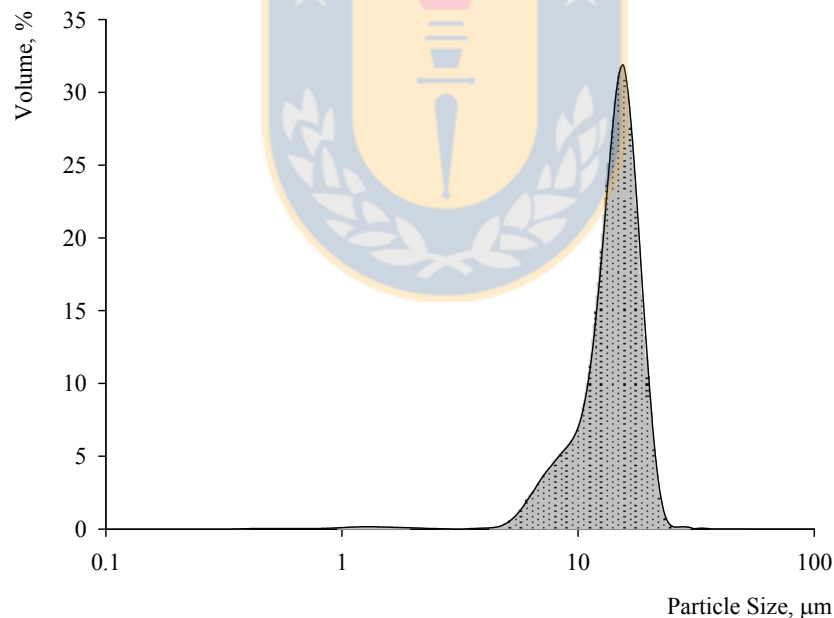


Figura 5.25. Distribución de tamaño de partícula para LPS 47 secado por atomización en presencia de WPGSSo.

Resultados similares fueron presentados por Ying *et al.* (2010) para *Lactobacillus GG* secado por atomización en presencia de una mezcla de proteína de suero (20%) y Hylon VII (20%).

5.3.5.2 Cinéticas de crecimiento y acidificación

Tal como ya se ha mencionado, una vez que las bacterias han sido estabilizadas fue necesario evaluar si las mismas mantenían las mismas características y propiedades que se habían encontrado en la cepa original y fresca (Golowczyc *et al.* 2010).

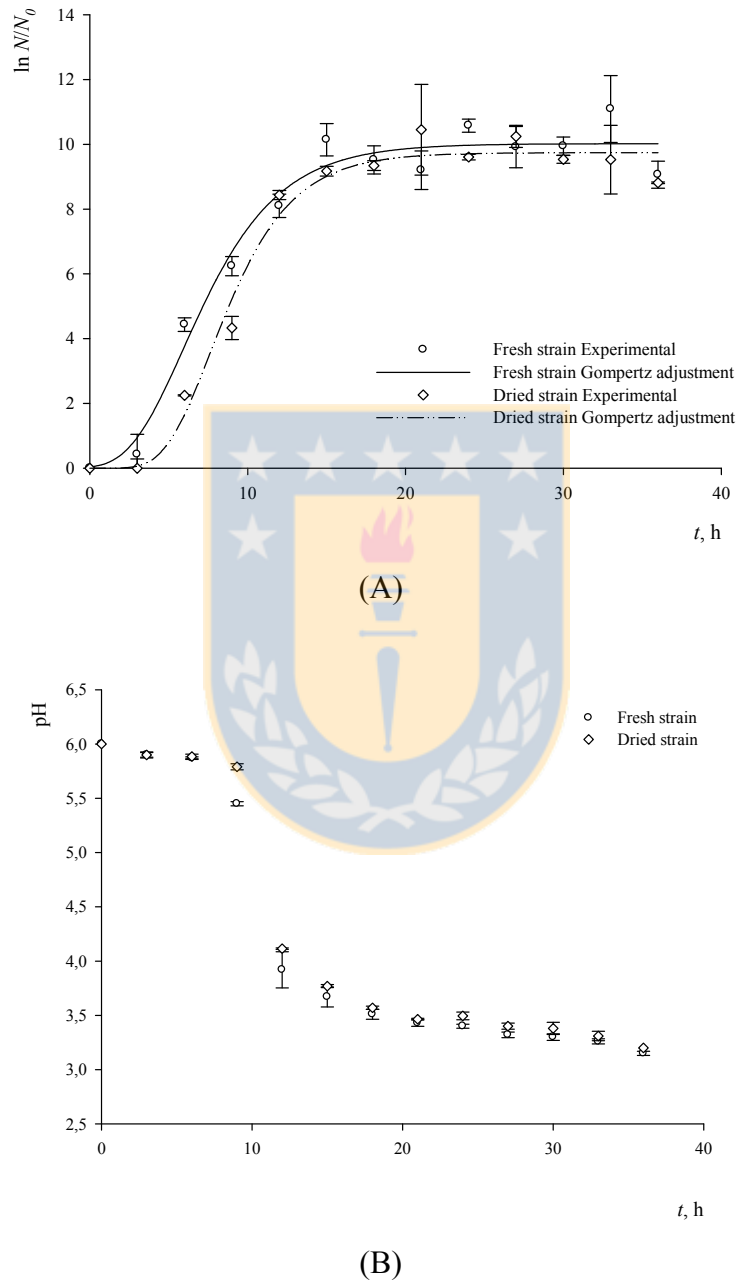


Figura 5.26. (A) Cinéticas de crecimiento y (B) Cinéticas de acidificación de *Lactobacillus plantarum* autóctono en sus formas fresca (\circ) y deshidratada (\diamond).

Las figuras 5.26A y B muestran las cinéticas de crecimiento y acidificación para *Lactobacillus plantarum* autóctono cultivado y estabilizado mediante secado por atomización haciendo uso de los mejores resultados obtenidos a lo largo de este trabajo, esto es, cultivo a 32°C sin estrés osmótico y utilizando la mezcla constituida por Proteína de suero-Glutamato-Sacarosa-Sorbitol (WPGSSo) como medio de encapsulación.

Lo primero que llama la atención de las figura 5.26A, es que el comportamiento de ambas condiciones de la cepa es casi el mismo. En ambos casos la fase estacionaria de crecimiento se alcanzó alrededor de las 15 horas y la concentración final de microorganismos al cabo de 36 horas de cultivo fue del orden de $2.0 \cdot 10^9$ UFC/ml. En relación a la variación de pH (figura 5.26B), en ambos casos se detectó una fuerte caída del mismo entre las 9 y 12 horas. Durante la fase exponencial de crecimiento, las velocidades máximas de crecimiento (μ_m) obtenidas haciendo uso del modelo de Gompertz (ec. 4.1) fueron 3.2 y 2.1 h⁻¹ para *L. plantarum* en sus formas fresca y deshidratada respectivamente. La diferencia puede estar relacionada con la atenuación que han sufrido las bacterias durante el secado, lo cual les lleva a gastar más tiempo tanto en su rehidratación como en su adaptación después del estado de latencia en el que se encuentran originalmente. Aún así, la viabilidad al finalizar el cultivo demuestra con creces la efectividad de la mezcla WPGSSo como material de protección durante y después del secado.

5.3.5.3 Resistencia a altas temperaturas

La figura 5.27A - D muestra las diferencias que presentaron las cepas deshidratada y fresca cuando fueron sometidas a altas temperaturas.

De la observación de las curvas queda claro que la cepa encapsulada presentó cierta sensibilidad, especialmente a las altas temperaturas, y a mayor tiempo de exposición. De hecho, en los primeros minutos los comportamientos de la cepa encapsulada y fresca son bastante similares, sin embargo, conforme avanza el tiempo las diferencias se van haciendo cada vez más grandes, frente a esto, es posible conjeturar que en la medida que transcurrió el tiempo, el material protector fue cambiando su estado dado que se fue hidratando y por tanto en algún punto dejó de ser esta cáscara que protegía a los microorganismos del ambiente hostil, llegado a este punto, aquellas bacterias que habían quedado con la membrana celular sensibilizada después del secado por atomización, no habrían sido capaces de resistir una nueva condición de estrés. Esta observación se valida con lo reportado por Silva *et al.* (2011) quién en su revisión señala que varios autores han determinado que la etapa de re-hidratación es

crítica para la sobrevivencia de los microorganismos que han pasado por un proceso de deshidratación a altas temperaturas (Costa *et al.* 2000; Morgan *et al.* 2006; Yadav *et al.* 2009), en forma general, se espera que este paso sea lo más “gentil” posible con el microorganismo, es decir, cuidando las condiciones de temperatura, de agitación, tiempo de hidratación o incluso la composición química de la solución en la que se re-hidratará. En este sentido, las bacterias encapsuladas de este experimento no habrían tenido ninguna de estas condiciones, por tanto, el sólo hecho que su comportamiento fuera medianamente similar al de la cepa original ya es algo positivo.

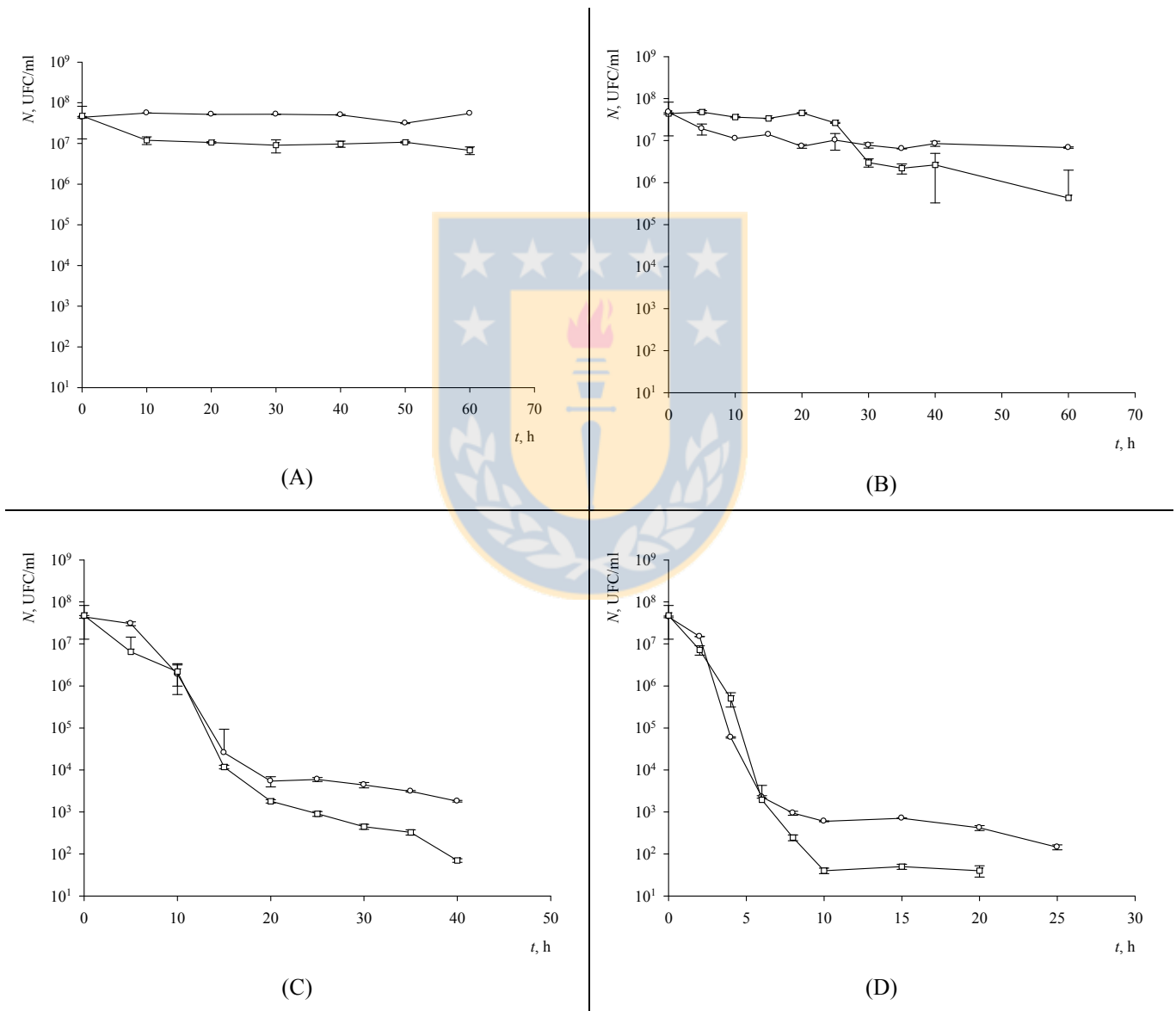


Figura 5.27 Curvas de mortalidad a 40°C (A), 50°C (B), 55°C (C) y 60°C (D) para *Lactobacillus plantarum* autóctono en sus formas fresca (○) y deshidratada (□).

5.3.5.4 Resistencia a ambientes ácidos

En la figura 5.28 se muestra la resistencia de la cepa a ambientes ácidos. En este caso la cepa que se encontraba encapsulada fue capaz de resistir en forma adecuada a pH=6.5 y pH=4.0, y mostró porcentajes de supervivencia muy similares a los que exhibió la cepa proveniente desde cepario (fresca), por ejemplo, para pH =4.0 los porcentajes de supervivencia fueron 52.6% y 47.8% para la cepa en sus forma fresca y deshidratada respectivamente. El análisis estadístico reveló que estas diferencias no eran significativas.

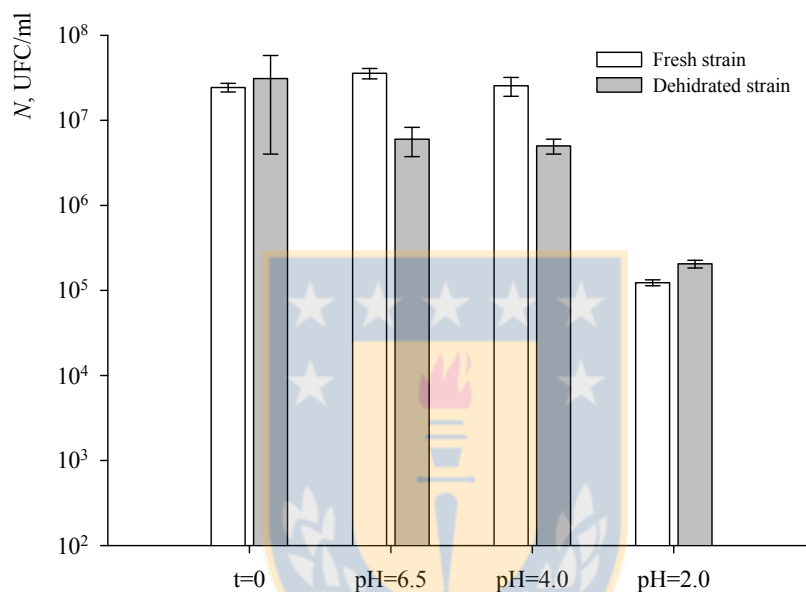


Figura 5.28. Efecto del pH en la supervivencia de *Lactobacillus plantarum* autóctono microencapsulado con Proteína de suero – Glutamato – Sacarosa – Sorbitol (WPGSSo). Los porcentajes que se muestran para los pH=2.0; 4.0 y 6.5 se midieron 4 horas después de inoculada la cepa.

Las mayores diferencias se observaron a pH=2.0, donde el porcentaje de supervivencia para la cepa fresca cayó por debajo de 0.5% mientras que la cepa encapsulada aún mostraba alrededor de un 2%. Un comportamiento similar fue observado por Mosilhey (2003), donde incluso, dependiendo del material de encapsulación, al cabo de dos horas no existía recuento alguno de microorganismos viables, especialmente a valores de pH entre 1.0 y 2.0. Para pH mayores o iguales a 4.0 la cepa (*L. acidophilus* en su caso) se comportó en forma análoga a la usada en este estudio y no presentó mayores diferencias en relación a las células libres, como las llama en su trabajo.

El hecho que a valores de acidez tan bajos la cepa encapsulada sea capaz de mantener la viabilidad de los microorganismos por sobre 10⁵ UFC/ml está relacionado con la protección que le brindan los

materiales de encapsulación. Es de esperar entonces, que si el producto deshidratado debe pasar por el estómago y enfrentarse a condiciones inhóspitas, un buen porcentaje de las bacterias será capaz de sobrevivir y asegurar con ello la colonización de la primera zona del intestino delgado. Es importante mencionar que en mediciones en terreno se encontró que el pH estomacal en salmones pre-smolt el valor del pH estomacal estaba alrededor de 4 – 4.5. Dicho valor puede modificarse dependiendo de la cantidad de alimento en el estómago, sin embargo, no se han reportado valores inferiores a un pH=2.0 para organismos de esta especie (Tittus, 2012).

Para cerrar este punto, no menos importante es recordar que estas bacterias en un principio eran cultivadas a una temperatura de 25°C, posteriormente, y de forma de mejorar su resistencia al secado se comprobó que las mismas eran capaces de crecer a 32°C, ahora bien, este ensayo fue llevado a cabo a 37°C, por tanto igual a de tomarse en cuenta que se tenían, en realidad dos condiciones desfavorables superpuestas y aún así, los resultados en el caso de las microcápsulas fueron positivos.

5.3.5.5 Inhibición de la cepa patógena *Yersinia ruckeri*

De acuerdo a lo que señalan Ringo *et al.* (2010), existe evidencia tanto *in vivo* como *in vitro* concerniente a la efectividad de tratamientos con probióticos en peces en presencia de patógenos tales como *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* o *Yersinia ruckeri*. Sin embargo, en todos los ensayos realizados, las bacterias utilizadas estaban en su forma fresca. En relación a esto, Gatesoupe (2007) plantea sus dudas en relación a la factibilidad de usar microorganismos inactivos para el mismo propósito, esto porque plantea que los mismos podrían ejercer una protección limitada en comparación a la que proveen las células activas.

En este trabajo, una vez que el crecimiento normal de la cepa deshidratada fue verificado, se hizo necesario evaluar si sus capacidades probióticas se habían alterado en algún sentido. En el caso particular de la cepa utilizada en este estudio, las características de mayor interés están relacionadas con su capacidad acidificante, la cual había mostrado era capaz de inhibir el crecimiento de patógenos.

El comportamiento de la cepa en su forma pura e inhibida se muestran en la figura 5.29, tal como puede verse, el crecimiento del patógeno fue claramente afectado por la cepa probiótica, en cualquiera de sus formas. Es así como después de un periodo de 48 horas los cultivos que no contenían la cepa de *Lactobacillus* alcanzaron una concentración de $7.4 \cdot 10^9$ UFC/ml mientras que aquellos en los cuales *L. plantarum* estuvo presente, el crecimiento de *Y. ruckeri* se vio disminuido en casi 2 ciclos logarítmicos

independiente de si la cepa estaba en su forma fresca o deshidratada. Estos resultados sientan un precedente para responder a la duda presentada por Gatesoupe (2007), en relación a los beneficios brindados por probióticos activos versus aquellos que pudieran conferir aquellos en su forma inactivada.

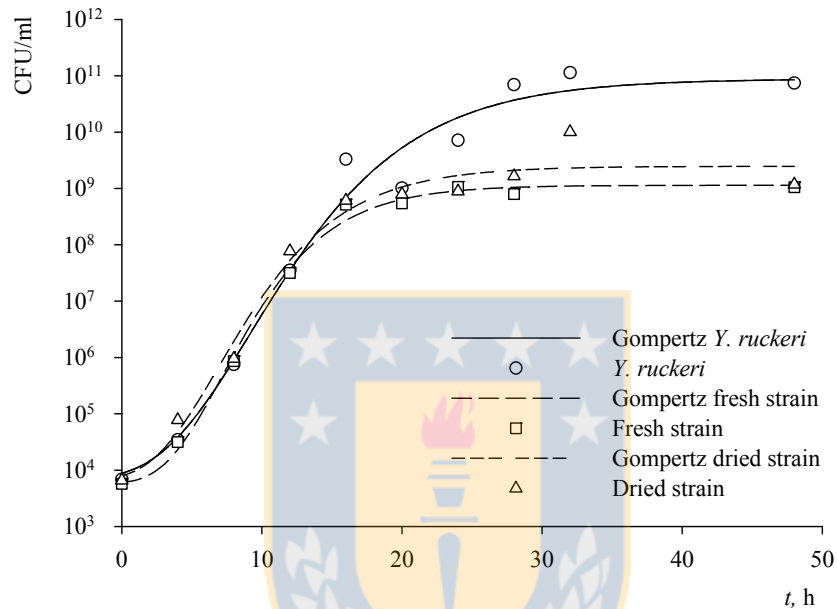


Figura 5.29. Cinética de crecimiento de *Yersinia ruckeri* pura (○) y en presencia de *Lactobacillus plantarum* LPS 47 en forma fresca (□) y deshidratada (Δ). Material de encapsulación: WPGSSo

5.3.6 Evidencia *in vivo* de la actividad probiótica de *Lactobacillus plantarum* autóctono

En forma paralela al desarrollo de esta tesis de grado, el grupo de biología marina asociado al proyecto de investigación realizó ensayos *in vivo* con alevines (20 – 40 g) a fin de verificar el comportamiento de la cepa LPS47 y el efecto que pudiera tener en estos organismos. Dentro de los principales hallazgos se encontró que los peces alimentados en forma continua con pellets conteniendo 10⁹ UFC/g alimento de la cepa fueron capaces de mantener una concentración de la misma de 10⁶ UFC/ml en el tracto gastrointestinal.

Una vez que los peces fueron alimentados por 28 días con esta dieta fueron expuestos a un ensayo de desafío al ser inoculados con una cepa patógena de *Flavobacterium psychrophilum* y se evaluó la mortalidad de los mismos en el tiempo, al finalizar el experimento, se encontró que aquellos peces que

habían tenido una alimentación probiótica mostraron un 33.3% de mortalidad versus un 80% de mortalidad en peces que habían recibido la alimentación tradicional.

Otra observación positiva en cuanto al uso de esta cepa radicó en que los peces alimentados con pellets probióticos mostraron una mayor tasa de crecimiento y ganancia de peso que aquellos alimentados en forma tradicional.

Estos resultados muestran el potencial en el uso de este tipo de probióticos en la industria salmonera, este trabajo por tanto abre una gran alternativa en cuanto al manejo del producto probiótico en si, ya que al estar en forma deshidratada se asegura su estabilidad y se disminuye el riesgo de contaminación, por otro lado existen más alternativas para que el mismo pueda ser incluido en la dieta de los peces, ya que podría incluirse directamente en la línea de producción de los pellets, tanto como aditivo dentro de los demás ingredientes sólidos, como resuspendido en aceite para la etapa de aceitado. Todo esto está aún en etapa de evaluación.



5.4 Pruebas a mayor escala

5.4.1 Ensayos escala piloto

Una vez que se decidieron las mejores condiciones de cultivo y las variables de operación para la membrana y el secador, el siguiente paso consistió en hacer ensayos a escala piloto. Dado que la microfiltración (o centrifugación) del caldo de fermentación terminó por ser opcional, en la tabla 5.15 se resumen los resultados para ambos casos.

Tabla 5.15. Resultados obtenidos para la formulación de producto probiótico usando *Lactobacillus plantarum* LPS 47 como principio activo. Escala piloto.

	Con microfiltración ⁵	Sin microfiltración Sin centrifugación
Volumen de cultivo, L	20	20
Viabilidad al final del cultivo batch, UFC/ml	$1.7 \cdot 10^{10}$	$1.3 \cdot 10^{10}$
Volumen concentrado, L	6.5	NC ⁶
Volumen permeado, L	10	NC
Volumen muerto, L	~2 – 3	NC
Viabilidad antes del secado, UFC/ml	$2.3 \cdot 10^{10}$	$2.8 \cdot 10^9$
Viabilidad antes del secado, UFC/g	$9.1 \cdot 10^{10}$	$1.1 \cdot 10^{10}$
Viabilidad después del secado, UFC/g	$1.5 \cdot 10^{10}$	$6.0 \cdot 10^9$
Producción, g	500	2250
Microorganismos estables disponibles, UFC	$7.5 \cdot 10^{12}$	$1.3 \cdot 10^{13}$
Rendimiento secador, %	~ 37	~ 45
Humedad Producto final, %	11.7	9.5

Los resultados aquí presentados muestran que es posible la obtención de un producto probiótico deshidratado de alta viabilidad (cercana a 10^{10} UFC/g) a escala piloto y que de acuerdo a los estudios realizados es capaz de tener una vida de estante bajo condiciones ambientales de por lo menos 6 meses. Considerando que la cantidad de microorganismos es ambos casos (con y sin MF) es prácticamente la misma, se recomienda, a no ser que sea requerimiento por parte del microorganismo (existen cepas que no sobreviven al secado a no ser que se retiren los metabolitos generados durante el cultivo), no utilizar esta operación y pasar desde el cultivo a la etapa de secado directamente, previa adición de la mezcla de protección.

⁵ Sólo se secó el concentrado probiótico. El permeado tenía una concentración de $3.6 \cdot 10^3$ UFC/g

⁶ No corresponde.

5.4.2 Ensayo escala semi - industrial

Como ya se mencionó, estos ensayos se llevaron a cabo bajo condiciones un poco diferentes a las estudiadas a lo largo de este trabajo, principalmente en lo que al secado se refiere. La tabla 5.16 resume los resultados

Tabla 5.16. Resultados obtenidos para la formulación de producto probiótico usando *Lactobacillus plantarum* LPS 47 como principio activo. Escala semi – industrial.

	Sin microfiltración, Sin centrifugación.
Volumen de cultivo, L	100
Viabilidad al final del cultivo batch, UFC/ml	$3.1 \cdot 10^9$
Viabilidad antes del secado, UFC/g	$1.2 \cdot 10^{10}$
Viabilidad después del secado, UFC/g	$9.3 \cdot 10^9$
Producción, g	11070
Microorganismos estables disponibles, UFC	$1.0 \cdot 10^{14}$
Rendimiento secador, %	~ 44.3
Humedad Producto final, %	8.1

Este último ensayo demostró ser una excelente culminación para este trabajo, habiendo logrado a nivel semi – industrial la producción de 11 kg de un producto probiótico estabilizado mediante la operación de secado por atomización y con una viabilidad $\sim 10^{10}$ UFC/g.

De lo que se tiene conocimiento, éste trabajo sienta un precedente en términos del uso de secado por atomización a gran escala para la producción de un producto probiótico cuyo principio activo no es otra cosa más que una cepa autóctona del género *Lactobacillus*. En el último tiempo, la mezcla de sustancias que conforman el material de encapsulación desarrollado durante esta tesis, se usó también con éxito en la protección de otra cepa probiótica autóctona aislada de leche materna y sometida a secado mediante liofilización a presión atmosférica en un lecho de impacto⁷.

⁷ R. Bórquez , P. Bustos , F. Caro and J. Ferrer (2013): Atmospheric Freeze-Impingement Drying of an Autochthonous microencapsulated Probiotic Strain, Drying Technology: An International Journal, 31:5, 535-548.

6. CONCLUSIONES

A partir del desarrollo de esta tesis es posible concluir lo siguiente:

Fue posible obtener biomasa con viabilidad igual o superior a 10^9 UFC/ml mediante el uso de un bioreactor operando indistintamente en modo discontinuo, fed – batch o continuo, en este sentido la cepa *L. plantarum* LPS 47 mostró una gran capacidad de adaptación y un comportamiento acidúrico lo cual facilitó el trabajo con ella. Sin perjuicio de lo anterior se decidió seguir con el cultivo en modo discontinuo sin control de pH, dado que permitía asegurar que la cepa no había sufrido otro tipo de estrés aparte del inherente de llegar a una fase estacionaria de crecimiento.

El cultivo en modo fed – batch permitió lograr la mayor concentración de ácido láctico en el medio (~ 40 g/L) y también el mayor recuento de microorganismos viables al cabo de 72 horas de cultivo (48 de ellas en modo semi – continuo). El cultivo en modo continuo si bien brindó la mayor productividad volumétrica de biomasa no mostró mayores concentraciones de ácido láctico o de recuento de microorganismos que los que habían presentado los cultivos en modo discontinuo o semi – continuo. Aún así, la cepa fue capaz de adaptarse a tiempos de residencia tan bajos como 4 h, sin ser lavada del reactor, es más, después de 6 tiempos de residencia, aún mantenía la viabilidad que tenía al finalizar el periodo discontinuo.

En el caso en que sea obligatoria la separación de la biomasa desde el caldo de fermentación, se encontró que operando una membrana de microfiltración Carbosep M14 bajo una presión transmembrana de 2 bar y una velocidad tangencial de 4 m/s fue posible aumentar en un factor de 2.5 el recuento de microorganismos viables obtenido al finalizar la operación de cultivo.

En general la membrana de microfiltración presentó un buen comportamiento, sin embargo, su funcionamiento se vio claramente influenciado por la presencia de proteínas en el medio de cultivo, esto porque las mismas fueron las responsables de gran parte del ensuciamiento sufrido por el equipo (resultados no mostrados, en preparación). Lamentablemente al retirar la mayor fuente proteínas del medio de cultivo (peptona de caseína) si bien fue posible reducir el ensuciamiento la viabilidad bajó de 10^9 a 10^7 UFC/ml lo cual deja de hacer atractivo el proceso, a no ser que el microorganismo realmente necesite ser separado del caldo de fermentación y por tanto se compensen los costos de mantener

operando la membrana a una baja densidad de flujo versus el valor agregado de la biomasa purificada propiamente tal.

En cuanto al secado por atomización, la cepa que ocupa este estudio, *Lactobacillus plantarum* LPS 47, fue capaz de ser deshidratada aún en presencia de todos los componentes de su caldo de fermentación, esto quiere decir, que se puede pasar directamente desde la etapa de cultivo a la etapa de secado, sin necesidad de centrifugar o concentrar mediante membranas. Importante es hacer notar que esta condición es particular para esta cepa, por lo tanto, el estudio realizado para el uso de membranas de microfiltración es totalmente válido, en el caso que se requiera usar otro tipo de bacteria ácido – láctica más restrictiva.

Las bacterias que pasaron por la membrana de microfiltración y que fueron posteriormente deshidratadas no presentaron ninguna diferencia en resistencia en comparación con aquellas bacterias que pasaron desde el cultivo directamente a la etapa de secado.

En términos de las variables de operación el uso de una presión de atomización de 2 bar y una temperatura de salida de 70°C, permitieron asegurar rendimientos por sobre el 35% una humedad del producto por debajo del 10%. El recuento de microorganismos después inmediatamente después del secado disminuyó cerca de 2 ciclos logarítmicos cuando no se usaron materiales de protección, sin embargo, con el uso de los mismos la viabilidad no disminuyó más allá de 0.5 ciclos logarítmicos.

El uso de materiales de encapsulación fue totalmente necesario para asegurar una buena estabilidad durante el almacenamiento. Dentro de estos la mezcla compuesta por Proteína de suero – Glutamato monosódico – Sacarosa – Sorbitol en proporción 17:1:1:1 fue la que dio mejores resultados, permitiendo que lo mismos mantuvieran una viabilidad de a lo menos 10^7 UFC/g por 7 meses, almacenados a 25°C sin control de humedad ambiental.

El uso de estrés osmótico durante el cultivo, contrario a lo que se pensaba, no tuvo ninguna incidencia positiva en la resistencia de los microorganismos a las altas temperaturas. Es más, en la medida que se aumentó la concentración de sal en el medio, las bacterias perdieron con mayor velocidad su viabilidad durante el almacenamiento, esto debido principalmente, a los daños asociados a nivel de membrana celular.

El comportamiento de la cepa deshidratada fue en todo sentido igual al comportamiento exhibido por la cepa fresca, esto es en términos del crecimiento, capacidad acidificante, resistencia a altas temperaturas y a ambientes ácidos. Y lo último, pero no menos importante, la cepa deshidratada manifestó el mismo poder inhibitorio que una cepa fresca en presencia de una cepa patógena. En ambos casos el crecimiento del patógeno se vio inhibido en a lo menos 1.5 ciclos logarítmicos. Los resultados obtenidos a escala de laboratorio fueron posibles de replicar tanto a nivel piloto como semi industrial.

Para finalizar, los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir que es posible obtener a gran escala un producto probiótico deshidratado estable de viabilidad superior a 10^9 UFC/g (llegando incluso a 10^{10} UFC/g) usando un esquema productivo del tipo cultivo en modo discontinuo – concentración por membranas – microencapsulación mediante secado por atomización, en la medida que se utilicen las condiciones de operación adecuadas a la cepa que se desea estabilizar y un conjunto de materiales de encapsulación que sean capaces en lo posible de cumplir con todas las características que se necesitan de un buen encapsulante.



7. REFERENCIAS

- Adamberg, K.; Kask, S.; Laht, T.M.; Paalme, T. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology* **2003**, 85, 171–183
- Aguirre – Ezkauriatza, E.J.; Aguilar – Yáñez, J.M.; Ramírez – Medrano, A.; Álvarez, M. M. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. *Bioresource Technology* **2010**, 101, 2837 – 2844.
- Altamirano, C.; Paredes, C.; Illanes, A.; Cairó, J.J.; Godia, F. Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. *Journal of Biotechnology* **2004**, 110, 171 – 179.
- Amrane, A.; Prigent, Y. Differentiation of pH and free lactic acid effects on the various growth and production phases of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **1999**, 74, 33 – 40.
- Amrane, A. Batch cultures of supplemented whey permeate using *Lactobacillus helveticus*: unstructured model for biomass formation, substrate consumption and lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technology* **2001**, 28, 827–834.
- Anal, A. K.; Singh, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology* **2007**, 18, 240 - 251.
- Ananta, E.; Volkert, M.; Knorr, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus GG*. *International Dairy Journal* **2005**, 15, 399 – 409.
- Arasaratnam, V.; Senthuran, A.; Balasubramiam, K. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lmtobacillus delbrueckii*. *Enzyme and Microbial Technology* **1996**, 19:482-486.
- Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th Ed.; AOAC International: Arlington, VA, **2000**.
- Balcázar, J.L.; de Blas, I.; Ruiz – Zarzuela, I.; Cunningham, D.; Vendrell, D.; Muzquiza, J.L. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* **2006**, 114, 173 – 186.
- Bailey, J., Ollis, D. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 1986, Second Edition, Mc Graw-Hill Book Co.
- Boyaval, P.; Lavenant, C.; Gesan, G.; Daufin, G. Transient and Stationary Operating Conditions on Performance of Lactic Acid bacteria crossflow microfiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, **1996**, 49, 786.

- Buethorn, S.; Carstensen, F.; Wintgens, T.; Melin, T.; Volmering, D.; Kossenkaul, K. Permeate flux decline in cross-flow microfiltration at constant pressure. *Desalination* **2010**, 250, 985 – 990.
- Burgos-Rubio, C., Okos, M. y Wankat, P. Kinetic Study of the Conversi3n of Different Substrates to Lactic Acid Using *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol. Prog.* **2000**, 16, 305.
- Buyukkileci, A.; Harsa, S. Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2004**, 79:1036–1040
- Cabello, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* **2006**, 8(7), 1137 – 1144.
- Carrère, H., Blaszkow, F. y Roux de Balmann, H. Modelling the clarification of lactic acid fermentation broths by cross-flow microfiltration. *J. Membr. Sci.* **2001**, 186, 219.
- Carrère, H., Blaszkow, F. y Roux de Balmann, H. Modelling the microfiltration of lactic acid fermentation broths and comparison of operating modes. *Desalination* **2002**, 145, 201 – 206.
- Carvalho, S.; Silva, J.; Ho, P.; Teixeira, P.; Malcata, X.; Gibbs, P. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnology Letters* **2002**, 24, 1587 – 1591.
- Carvalho, S.; Silva, J.; Ho, P.; Teixeira, P.; Malcata, X.; Gibbs, P. Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Lait* **2003**, 83, 203 – 210.
- Carvalho, S.; Silva, J.; Ho, P.; Teixeira, P.; Malcata, X.; Gibbs, P. Effects of Various Sugars Added to Growth and Drying Media upon Thermotolerance and Survival throughout Storage of Freeze-Dried *lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*. *Biotechnol. Prog.* 2004, 20, 248-254
- Casp, A., Abril, J. Procesos de Conservaci3n de alimentos. 1^{ra} ed. 1999. *Med. A. Madrid Vicente - Mundi*. Madrid, Espa1a.
- Cebeci, A.; Gurakan, C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology* **2003**, 20, 511 – 518.
- Chan R.; Chen, V. The effects of electrolyte concentration and pH on protein aggregation and deposition: critical flux and constant flux membrane filtration. *Journal of Membrane Science* 2001, 185 (2), 177 – 192.
- Chávez, B.E.; Ledebor, A.M. Drying of probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology* **2007**, 25, 1193 - 1201.
- Chilealimentos, Asociaci3n de Empresas de Alimentos de Chile. <http://www.chilealimentos.com/2013/index.php/es/noticias/alimentos-procesados/productos-del-mar.html>. Último acceso en Julio 2013.
- Choi, H.; Zhang, K.; Dionysiou, D.; Oerther, D.; Sorial, G. Influence of cross-flow velocity on

- membrane performance during filtration of biological suspension. *Journal of Membrane Science* **2005**, 248, 189 – 199.
- Corcoran, B.M.; Ross, R.P., Fitzgerald, G.F.; Stanton, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology* **2004**, 96, 1024 – 1039.
- Corcoran, B., Ross, R., Fitzgerald, G.F., Dockery, P. y Stanton, C. Enhanced Survival of GroESL-Overproducing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 under Stressful Conditions Induced by Drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72(7), 5104.
- Costa, E.; Usall, J.; Teixido, N.; García, N.; Vin, I. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology* **2000**, 89, 793 – 800.
- Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Carpenter, F.; Aurell, C. Stabilization of dry phospholipids bilayers and proteins by sugars. *Biochemical Journal* **1987**, 242, 1 – 10.
- Csonka, L. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological reviews* **1989**, 53(1), 121 – 147.
- Demirci, A.; Pometto, A.; Lee, B.; Hinz, P. Media Evaluation of Lactic Acid Repeated-Batch Fermentation with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* Subsp. *Rhamnosus*. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 4771-4774.
- Desai, K.G.H.; Park, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology* **2005**, 23, 1361 – 1394.
- Desmond, C.; Ross, R.P.; O’Callaghan, E.O.; Fitzgerald, G.; Stanton, C. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology* **2002**, 93, 1003 – 1011.
- Desmond, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. y Ross, R. Improved Stress Tolerance of GroESL-Overproducing *Lactococcus lactis* and Probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70(10), 5929.
- Ding, S. y Tan, T.L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochem.* **2006**, 41, 1451.
- Dorka, P. Modelling Batch and Fed-batch Mammalian Cell Cultures for Optimizing MAb Productivity. University of Waterloo, Thesis requeriment for the degree of Master of Applied Science in Chemical Engineering. **2007**, 197 pag. Ontario, Canadá.
- Elezi, O. *et al.* Food Additive Lactic Acid Production by Immobilized Cells of *Lactobacillus brevis* on Delignified Cellulosic Material *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 5285-5289

- Espina, F. y Packard, V.S. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in a spray-drying process. *J. Food Prot.* **1979**, 42 (2), 149.
- Ferreira, V.; Soares, V.; Santos, C.; Silva, J.; Gibbs, P.; Teixeira, P. Survival of *Lactobacillus sakei* during heating, drying and storage in the dried state when growth has occurred in the presence of sucrose or monosodium glutamate. *Biotechnology Letters* **2005**, 27, 249 – 252.
- Fitriani, Kokugan, T. Cross-Flow Microfiltration Characteristics of *Streptococcus bovis* in the Lactic Acid Fermentation Broth Produced by Fresh Cassava Roots. *Journal of Chemical Engineering of Japan* **2010**, 43(12), 983 – 992.
- Fitzpatrick, J.; Ahrens, M.; Smith, S. Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate. *Process Biochemistry* **2001**, 36, 671–675
- Foley, G.; McCarthy, A.; Walsh, P.K. Evidence for shape-dependent deposition in crossflow microfiltration of microbial cells. *Journal of Membrane Science* **2005**, 311 – 313 .
- Foley, G. A review of factors affecting filter cake properties in dead-end microfiltration of microbial suspensions. *Journal of Membrane Science* **2006**, 274, 38–46
- Font de Valdez, G.; De Giori, G.; De Ruiz Holgado, A.; Oliver, G. Effect of Drying Medium on Residual Moisture Content and Viability of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **1985**, 49(2), 413 – 415.
- Font de Valdez, G.; De Giori, G.; De Ruiz Holgado, A.; Oliver, G. Protective Effect of Adonitol on Lactic Acid Bacteria Subjected to Freeze-Drying. *Applied and Environmental Microbiology* **1983**, 45 (1), 302 – 304.
- Gardiner, G.; Sullivan, E.; Nelly, J.; Auty, A.; Fitzgerald, G.; Collins, J.; Ross, R.; Stanton, C. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied Environmental Microbiology* **2000**, 66 (6), 2605-2612.
- Garneau, S.; Martin, N.; Vederas, J. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* **2002**, 84, 577–592
- Garro, M.; de Valdez, G.; de Giori, G. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. *Food Microbiology* **2001**, 21, 511 – 518.
- Gatesoupe, F.J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **2007**, 14, 107 – 114.
- Gibbs, B. F.; Kermasha, S.; Alli, I.; Mulligan, C. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **1999**, 50 (3), 213 – 224.

- Giorno, L., Chojnacka, K., Donato, L. y Drioli, E. Study of a Cell Recycle Membrane Fermentor for the Production of Lactic Acid by *Lactobacillus bulgaricus*. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2002**, 41, 433.
- Glaasker, E., Konings, W.N. y Poolman, B. Glycine Betaine Fluxes in *Lactobacillus plantarum* during Osmostasis and Hyper- and Hypo-osmotic shock. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271 (17), 10060.
- Glaasker, E.; Tjan, F.S.; Ter Steeg, P.F.; Konings, W.N.; Poolman, B. Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. *Journal of Bacteriology* **1998**, 180(17), 4718 – 4723.
- Göksungur, Y.; Güvenç, U. Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO3202. *J.Chem. Tech. Biotechnol.* **1997**, 69, 399.
- Golowczyc, M. A.; Gerez, C.L.; Silva, J.; Abraham, A.G.; De Antoni, G.L.; Teixeira, P. Survival of spray-dried *Lactobacillus kefir* is affected by different protectants and storage conditions. *Biotechnology Letters* **2010**, DOI 10.1007/s10529-010-0491-6.
- Guerra, N.; Rua, M.; Pastrana, L. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *International Journal of Food Microbiology* **2001**, 70, 267–281
- Guerzoni, M. E.; Lanciotti, R.; Coconcelli, S. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology* **2001**, 147, 2255 – 2264.
- Guillot, A.; Obis, D.; Mistou, M.Y. Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *International Journal of Food Microbiology* **2000**, 55 (3), 47 – 51.
- Guyot, J.P.; Calderon, M.; Guyot, M. Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. *Journal of Applied Microbiology* **2000**, 88, 176–182
- Hayakawa, K., Sansawa, H., Nagamune, T. y Endo, C. High Density Culture of *Lactobacillus casei* by a Cross Flow Culture Method Based on Kinetic Properties of the Microorganism. *J. Ferment. Bioeng.* **1990**, 70(6), 404.
- Hwang, C.; Chen, J.; Huang, Y.; Mao, Z. Biomass production of *Lactobacillus plantarum* LP02 isolated from infant feces with potential cholesterol lowering ability. *African Journal of Biotechnology* 2011, 10(36), 7010-7020.
- Johnson, J.A.C. y Etzel, M.R. Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 attenuated by spray-drying, freeze-drying or freezing. *J. Dairy Sci.* **1995**, 78(4), 761.
- Kesarcodi-Watson, A.; Kaspar, H.; Lategan, M.J.; Gibson, L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanism of action and screening processes. *Aquaculture* **2008**, 274, 1 – 14
- Kets, E.P.W.; Teunissen, P.J.M ; Bont, J. A.M. Effect of compatible solutes on survival of lactic acid

- bacteria subjected to drying. *Applied and Environmental Microbiology* **1996**, 62 (1), 259 – 261.
- Kim, S. y Bhowmik, S. Survival of Lactic Acid Bacteria during Spray Drying of Plain Yogurt. *J. Food Sci.* **1990**, 55 (4), 1008.
- Kim, W. S.; Perl, L.; Park, J. H.; Tandianus, J.E.; Dunn, N.W. Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Current Microbiology* **2001**, 43, 346 – 350.
- Kosin, B.; Rakshit, S.K. Microbial and Processing Criteria for Production of Probiotics: A Review. *Food Technol. Biotechnol* **2006**, 44(3), 371 – 379.
- Kulozik, U.; Wilde, J. Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme and Microbial Technology* **1999**, 24, 297–302.
- Labuza, T.P., Jones, A.J., Sinskey, A. J., Gomez, R., Wilson, S. y Miller, B. (1972). Effect of drying conditions on cell viability and functional properties of single-cell protein. *J. Food Sci.* **1972**, 37, 103.
- Leslie, S.B.; Israeli, E.; Lighthart, B.; Crowe, J. H.; Crowe, L.M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology* **1995**, 61 (10), 3592 – 3597.
- Li, X. Y.; Chen, X. G.; Liu, C.S.; Peng, H. N.; Cha, D. S. Effect of trehalose and drying process on the survival of encapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Drying Technology* **2008**, 26, 895 – 901.
- Li, X.; Lin, S. X.; Chen, X.; Chen, L.; Pearce, D. Inactivation kinetics of probiotic bacteria during the drying of single milk droplets. *Drying Technology* **2006**, 24, 695 – 701.
- Lin, W.; Hwang, C.; Chen, L.; Tsen, H. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiology* **2006**, 23, 74–81
- Linders, L.; Kets, E.; Bont, J.; Van't Riet, K. Combined Influence of Growth and Drying Conditions on the Activity of Dried *Lactobacillus plantarum*. *Biotechnol. Prog.* **1998**, 14 (3), 537 -539.
- Lojkine, M., Field, R. y J. Howell. Crossflow Microfiltration of Cell Suspensions: A Review of Models with emphasis on Particle size effects. *TransIChem.* **1992**, 70 (Part C), 149.
- Lorca, G.L.; Raya, R.R.; Taranto, M.P.; de Valdez, G.F. Adaptative acid tolerant response in *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnology Letters* **1998**, 20 (3), 239-241.
- Lorca, G.L.; Font de Valdez, G. A Low-pH-Inducible, Stationary-Phase Acid Tolerance Response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. *Current Microbiology* **2001**, 42, 21 – 25.
- Lucca, María E. Aspectos sobre Fisiología y Nutrición de *Candida Utilis sp* en Cultivo Continuo con Limitación de Nutrientes. Tesis Doctoral, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina, **1993**.

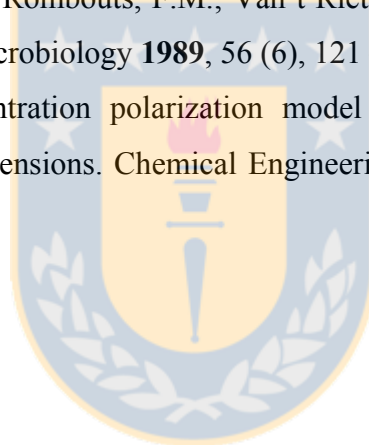
- Luedeking, R., and Piret, E. A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation. Batch Process at Controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng.* **1959**, 1 (4), 393-412.
- Marcobal, A. *et al.* A multifactorial design for studying factors influencing growth and tyramine production of the lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* CECT 4669 and *Enterococcus faecium* BIFI-58. *Research in Microbiology* **2006**, 157, 417 – 424.
- Martos, G.I.; Minahk, C.J.; Font de Valdez, G.; Morero, R. Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *Letters in Applied Microbiology* **2007**, 45, 282 – 288.
- Mauriello, G., Aponte, M., Andolfi, R., Moschetti, G. y Villani, F. Spray-Drying of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria. *J. Food Prot.* **1999**, 62 (7), 773.
- Meng, X.C.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.F.; Daly, C.; Ross, R. P. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry* **2008**, 106, 1406 – 1416.
- Menshutina, N. V.; Gordienko, M.G.; Voinovskiy, A. A.; Zbicinski, I. 2010. Spray drying of probiotics: Process development and scale-up. *Drying Technology* **2010**, 28, 1170 – 1177.
- Milcent, S. y Carrère, H. (2001). Clarification of lactic acid fermentation broths. *Sep. Pur. Technol.* **2001**, 22-23, 393.
- Millanao, A.; Barrientos, M.; Gómez, C.; Tomova, A.; Buschmann, A.; Dölz, H.; Cabello, F. Injudicious and excessive use of antibiotics: Public Health and salmon aquaculture in Chile. *Rev. Med. Chile* **2011**, 139, 107 – 118.
- Mondragón-Parada, M. *et al.* Lactic Acid Bacteria Production From Whey. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2006, 134, 223 – 232.
- Monteagudo, J.M.; Rodríguez, L.; Rincón, J.; Fuertes, J. Kinetics of Lactic Acid Fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* Grown on Beet Molasses. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1997**, 68, 271 – 276.
- Morgan, C.A.; Herman, N.; White, P.A.; Vesey, G. Preservation of micro-organism by drying: A review. *Journal of Microbiological Methods* **2006**, 66, 183 - 193.
- Mosilhey, S.H. Influence of different Capsule Materials on the Physiological Properties of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. Institut für Lebensmitteltechnologie. Inaugural – Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor–Ingenieur. **2003**, 166 pag.
- Mozzi, F.; Raya, R.; Vignolo, G.M. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications.* Wiley – Blackwell. ISBN: 978-0-813-81583-1. **2010**.
- Mrad, N., Bonazzi, C.; Boudhrioua, N.; Kechaou, N.; Courtois, F. Moisture Sorption Isotherms, Thermodynamic Properties and Glass Transition of Pears and Apples. *Drying Technology: An International Journal* 2012, 30 (13), 1397 – 1406.

- Oelschlaeger, T.A. Mechanisms of probiotic actions – A review. *Int. J. Med Microbiol.* **2010**; 300: 57 – 62.
- Oliveira, A.C.; Moretti, T.S. Boschini, C.; Baliero, J. C.C.; Freitas, L.A.P.; Freitas, O.; Favaro-Trindade, C.S. Microencapsulation of *B.lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying. *Drying Technology* **2007**, 25 (10), 1687 - 1693.
- Picot, A.; Lacroix, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal* 2004, 14, 505 – 515.
- Peighambardoust, S.H.; Tafti, A. G.; Hesari, J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science and Technology* **2011**, 22(5), 215 - 224.
- Persson, A., Johnsson, A. y Zacchi, G. Separation of Lactic Acid-Producing Bacteria from Fermentation Broth Using a Ceramic Microfiltration Membrane with Constant Permeate Flow. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 72(3), 269.
- Pimentel, D.J.; Campos, R.G.; Lobato, C.; Pedroza, R.; Vernon, E. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International* **2009**, 42, 292 – 297.
- Prasad, J., McJarow, P. y Gopal, P. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69(2), 917.
- Razatos, A.; Ong, Y.; Sharma, M.; Georgiou, G. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 11059–11064.
- Ré, M.I. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology* **1998**, 16 (6), 1195 – 1236.
- Ringo, E.; Lovmo, L.; Kristiansen, M.; Bakken, Y.; Salinas, I.; Myklebust, R.; Olsen, R. E.; Mayhew, T.M. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture Research* **2010**, 41, 451 – 467.
- Ripperger, S.; Altmann, J. Crossflow microfiltration – state of the art. *Separation and Purification Technology* **2002**, 26, 19 – 31.
- Riveros, B.; Ferrer, J.; Borquez, R. Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Drying Technology* **2009**, 27, 123 – 132.
- Ross, R., Desmond, C., Fitzgerald, G. y Stanton, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, 98, 1410.

- Saarela, M., Rantala, M., Hallamas, K., Nohynek, L., Virkajärvi, I y Mättö, J. Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, 96, 1205.
- Salminen, S., Wright, A. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. **1998**, 2nd ed. *Marcel Dekker, Inc.* New York, New York.
- SalmonChile Report. Summary of the Chilean salmon industry (N°1/2008), <http://www.salmonchile.cl/frontend/index.asp> . **2008**. Last Access on July 2013.
- Santivarangkna, C.; Kulozik, U.; Foerst, P. Inactivation mechanism of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology* **2008**, 105, 1 – 13.
- Schepers, A.W.; Thibault, J.; Lacroix, C. *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pHcontrolled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. multiple factor kinetic analysis. *Enzyme and Microbial Technology* **2002**, 30, 176–186
- Shiga, H.; Yoshii, H.; Nishiyama, T.; Furuta, T.; Forssele, P.; Poutanen, K.; Linko, P. Flavor encapsulation and release characteristics of spray – dried powder by the blended encapsulant cyclodextrin and gum arabic. *Drying Technology* **2001**, 19 (7), 1385 – 1395.
- Shimizu, H.; Mizuguchi, T.; Tanaka, E.; Shioya, S. Nisin Production by a Mixed-Culture System Consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. *Applied and Environmental Microbiology* **1999**, 65(7), 3134 – 3141.
- Silva, J.; Carvalho, A.S.; Pereira, H.; Teixeira, P.; Gibbs, P.A. Induction of stress tolerance in *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* by the addition of sucrose to the growth medium. *Journal of Dairy Research* **2004**, 71, 121 – 125.
- Silva, J.; Freixo, R.; Pereira, H.; Teixeira, P.; Gibbs, P.A. Spray drying for the production of dried cultures. *International Journal of Dairy Technology* **2011**, 64 (3), 321 – 335.
- Son, V. M.; ChinChyuan, C.; MiChen, W.; YuanKuang, G.; ChiuHsia, C.; Winton, C. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology* **2009**, 26(5), 691-698.
- Sunny-Roberts, E.O.; Knorr, D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. *International Dairy Journal* **2009**, 19, 209 – 214.
- Tanaka, T., Asakawa, A., Yoshida, H. y Nakanishi, K. Filtration Characteristics and Structure of Cake in Crossflow Filtration of Bacterial Suspension. *Journal of fermentation and bioengineering* **1994**, 78(6), 455 – 461.

- Tanaka, T., Usui, K., Kouda, K. y Nakanishi, K. Filtration Behaviors of Rod-Shaped Bacterial Broths in Unsteady-State phase of cross-flow Filtration. *J. Chem. Eng. Jpn.* **1996**, 29(6), 973.
- Teixeira, P. C., Castro, M.H. y Kirby, R.M. Inducible thermotolerance in *Lactobacillus bulgaricus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **1994**, 18, 218.
- Teixeira, P. C., Castro, M.H. y Kirby, R.M. Death kinetics of *Lactobacillus bulgaricus* in a Spray Drying Process. *J. Food Prot.* **1995a**, 57 (8), 934.
- Teixeira, P.C.; Castro, M.H.; Kirby, R.M.. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Applied Bacteriology* **1995b**, 78 (4), 456 – 462.
- Teixeira, P. C., Castro, M.H., Malcata, F. X. y Kirby, R.M. Survival of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* following spray-drying. *J. Dairy Sci.* **1995c**, 78(5), 1025.
- Teixeira, P. C., Castro, M.H. y Kirby, R.M. Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* **1996**, 22, 34.
- Telang, A. M.; Thorat, B.N. Optimization of process parameters for spray drying of fermented soy milk. *Drying Technology* **2010**, 28, 1410 – 1456.
- To, B. y Etzel, M. Spray Drying, Freeze Drying or Freezing of three Different Lactic Acid Bacteria Species. *J. Food Sci.* **1997**, 62 (3), 576.
- Toledo, N.; Ferrer, J.; Bórquez, R. Drying and storage stability of a probiotic strain incorporated into a fish feed formulation. *Drying Technology* **2010**, 28, 508 – 516.
- Tymczynsyn, E., Gómez-Zavaglia, A. y Disalvo, E. Influence of the growth at high osmolality on the lipid composition, water permeability and osmotic response of *Lactobacillus bulgaricus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, 443, 66.
- Van de Guchte, M.; Serror, P.; Chervaux, C.; Smokvina, T.; Ehrlich, S. D.; Magin, E. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **2002**, 82, 187 – 216.
- Varsha, S.; Bhaskar, T. Formulation and cost-effective drying of probiotic yeast. *Drying Technology* **2011**, 29, 749 – 757.
- Vazquez, J.A.; Mirón, J.; González, M.P.; Murado, M.A. Effects of Aeration on Growth and on Production of Bacteriocins and Other Metabolites in Cultures of Eight Strains of Lactic Acid Bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2005**, 127.
- Vereecken, K.; Impe, J.F. Analysis and practical implementation of a model for combined growth and metabolite production of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **2002**, 73, 239 – 250.
- Wang, D., Cooney, C. *Fermentation and Enzyme Technology*. 1978, First Edition, John Wiley & Sons.
- Wang, S.; Langrish, T. The use of surface active compounds as additives in spray drying. *Drying*

- Technology **2010**, 28, 341 – 348.
- Washburn, E.W. The dynamics of capillary flow. *Phys. Rev.* **1921**, 17, 273 – 283.
- Whitaker, R. y Batt, C. (1991). Characterization of the Heat Shock Response in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(5), 1408.
- Xavier, A.M.R.B., Goncalves, L.M.D., Moreira, J. L. y Carrondo, M.J.T. (1994). Operational Patterns Affecting Lactic Acid Production in Ultrafiltration Cell Recycle Bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 45, 320.
- Ying, Dan Yang *et al.* Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. *Journal of Food Science* 2010, 75 (9), 588 – 595.
- Yu, C.; Wang, W.; Yao, H.; Liu, H. Preparation of phospholipid microcapsule by spray drying. *Drying Technology* **2007**, 25, 695 – 702.
- Zwietering, M.H.; Jongenburger, I.; Rombouts, F.M.; Van't Riet, K. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied Environmental Microbiology* **1989**, 56 (6), 121 – 147.
- Zydney, A.; Colton, C. A concentration polarization model for the filtrate flux in cross flow microfiltration of particulate suspensions. *Chemical Engineering Communications* **1996**, 47:1-3, 1-21.



APÉNDICES

A. Lavado de membranas

Previo a cada experimento se desinfectó con 200 ppm de hipoclorito de sodio, para entonces enjuagar con agua destilada hasta eliminar cualquier residuo de cloro en el módulo.

Finalizada la experimentación, se hace un enjuague con abundante agua destilada (3 a 5 veces el volumen muerto del módulo) y luego se efectúa el lavado químico, que consiste en NaOH a 80°C a una concentración de 10g/L por una hora, para luego hacer lavados con agua destilada a 80°C hasta obtener un pH neutro en los flujos de salida. Logrado esto, se desinfecta nuevamente con 200 ppm de hipoclorito de sodio a 25°C y luego se enjuaga con abundante agua destilada a temperatura ambiente.



B. Procedimiento de secado por atomización

El procedimiento para el secado por atomización es el siguiente:

Preparación del equipo

Limpiar la parte interna de cada una de las piezas del secador con etanol al 70%.

Ensamblar el equipo

Conectar termocuplas, manguera de alimentación y depósito de recepción.

Activar la energía general y encender el equipo siguiendo este orden, verificar cada uno de los pasos antes de continuar con el siguiente: principal>ventilador>resistencias

Activar las resistencias 1 y 4, 1200 y 5400W respectivamente.

Calentar el equipo hasta que la temperatura a la entrada del ciclón indique los 120 °C (30 min. aproximadamente), mantener dicha temperatura por 30 minutos.

Abrir la llave de paso de aire comprimido y fijar la válvula en 2 bar.

Alimentar agua destilada al sistema a través de la bomba peristáltica a razón de 70-80 ml/min hasta que la temperatura llegue a la temperatura de operación del secador.

Alimentación

Una vez que se han alcanzado los 70°C cambiar la manguera desde el agua destilada a la solución a secar, manipular el caudal de la bomba para mantener la temperatura de salida constante.

Finalizada esta etapa, pasar agua destilada otra vez a por 5 minutos, manteniendo la temperatura.

Golpear con alguna herramienta afín el codo de salida y ciclón, con el fin de retirar las partículas adheridas al sistema.

Retirar el producto seco.

Apagado del equipo

Apagar las resistencias, detener la alimentación (bomba) y cerrar la válvula de aire comprimido.

Una vez que el equipo esté frío (20 min. aproximadamente), apagar el panel en sentido inverso: resistencias>ventilador>general, posteriormente cortar la energía general.

Desmontar los instrumentos, desarmar el equipo y limpiar.

C. Composición aproximada de soluciones de sales saturadas

	Humedad relativa a 25°C, %	Sal, g	Agua, ml
Cloruro de litio	11.3	150	85
Acetato de potasio	22.5	200	65
Cloruro de magnesio	32.8	200	25
Carbonato de potasio	43.2	200	90
Bromuro de sodio	57.6	200	80
Cloruro de sodio	75.3	200	60

